

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie

**Neuroprotektivní efekt  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon  
glutamátu v animálním modelu  
ischemického poškození mozku**

**A neuroprotective effect of  $3\alpha5\beta$ -  
pregnanolon glutamate in the animal model  
of ischemic brain injury**

Lenka Kletečková

Praha 2012

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Valeš PhD.

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s využitím řádně citovaných literárních zdrojů a s pomocí rad poskytnutých mým školitelem.

V Praze dne 23. 8. 2012

Lenka Kletečková

## Poděkování

Nejprve bych zde chtěla poděkovat mému školiteli RNDr. Karlu Valešovi za jeho čas, rady a trpělivost, kterou mi věnoval při vypracování této práce a jeho neustále dobrou náladu.

Dále bych chtěla poděkovat celému oddělení Neurofyzologie paměti zejména RNDr. Janovi Svobodovi za pomoc se statistickým vyhodnocením a Ing. Lukáši Rambouskovi za podnětné připomínky.

Také bych chtěla poděkovat MUDr. Petru Zachovi a Mgr. Grigorijovi Tsenovovi PhD. za trpělivost, ochotu mne učit a velkou pomoc po metodické stránce.

Velký dík patří mé rodině, přátelům a příteli za podporu a motivaci.

## Abstrakt

Neuroaktivní steroid  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát ( $3\alpha5\beta$ P-Glu) je syntetický analog přirozeně se vyskytujícího  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon sulfátu. Obě látky inhibují preferenčně use-dependentním mechanismem tonicky aktivované NMDA receptory. Podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu by mohlo zmírnit excitotoxické poškození mozku při ischemických podmínkách, v kterých hraje roli nadměrná aktivace NMDA receptorů.

Předmětem této práce je stanovit vliv systémového podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok v mozku laboratorního potkana. Dále také zavést a kriticky zhodnotit animální model globálního ischemického poškození mozku. Konečným cílem je posoudit neuroprotektivní potenciál  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu na kognitivní funkce na základě tohoto modelu.

Saturace kyslíku a regionální krevní průtok byly měřeny v oblasti dorzálního hippocampu. Po aplikaci  $3\alpha5\beta$ P-Glu došlo k signifikantnímu zvýšení hodnot obou sledovaných parametrů. Tento náález potvrzuje předpoklad neuroprotektivního efektu  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu.

Jako model globálního ischemického poškození mozku jsme zvolili bilaterální okluzi *arteriae carotis communis* a následné umístění zvířete do hypoxického boxu. Aplikace  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu signifikantně zvýšila přežívání zvířat. Nicméně Morrisovo vodní bludiště ani aktivní alotetické vyhýbání se místu neprokázaly signifikantní efekt  $3\alpha5\beta$ P-Glu na uchování kognitivních funkcí.

Podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu vede k zvýšení saturace kyslíku a regionálního průtoku za fyziologických podmínek a snížení úmrtnosti zvířat po ischemicko-hypoxickém stavu. Navíc  $3\alpha5\beta$ P-Glu nevyvolává žádné nežádoucí účinky typické pro nekompetitivní NMDA antagonisty.

Klíčová slova:  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát ( $3\alpha5\beta$ P-Glu), NMDA receptor, neuroaktivní steroidy, neuroprotektivní efekt, ischemické poškození mozku

## Abstract

The neuroactive steroid 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamate (3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu) is the synthetic analogue of a naturally-occurring 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon sulfate. Both agents inhibit preferentially tonically activated NMDA receptors by a use-dependent mechanism. The application of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu could reduce the excitotoxic injury of the brain during ischemic conditions, in which plays role the excessive activation of NMDA receptors.

The objectives of this study are to determine the effect of systemic application of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu on an oxygen saturation and a regional cerebral blood flow in the brain of laboratory rat. Subsequently to establish and critically evaluate the animal model of a global ischemic brain injury. Finally to test the neuroprotective potential of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu on cognitive functions in this model.

The oxygen saturation and regional cerebral blood flow were measured in the area of dorsal hippocampus. Both observed parameters were significantly increased after the application of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu. These findings confirm the assumption that 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu has a neuroprotective effect.

The bilateral occlusions of *arteriae carotis communis* following placement of the rat into a hypoxic box has been utilized as a model of global ischemic brain injury. The application of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu increased significantly the rats survival. However, neither a Morris water maze nor an active allothetic place avoidance task showed significant effect of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu in the restoring of cognitive functions.

Taken together, the application of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu led to an increase in the oxygen saturation and regional cerebral blood flow during physiological conditions and reduced the mortality of rats after ischemia-hypoxic conditions. Furthermore, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu induced no side effects that are typical for noncompetitive NMDA antagonists.

Key words: 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamate (3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu), neuroactive steroids, NMDA receptor, neuroprotective effect, ischemic brain injury

## Seznam použitých zkratek

3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu - 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-L-glutamyl- 1-ester, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu)

3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-HS - 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon hemisukcinát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl hemisukcinát)

3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-S - 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát)

3 $\alpha$ HSD - 3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenáza

3 $\beta$ HSD - 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát

AAPA - aktivní alotetické vyhýbání se místu

CDX - (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrin

CNS - centrální nervový systém

CT - počítačová tomografie

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEAS - dehydroepiandrosteron sulfát

GABA -  $\gamma$ -amino máselná kyselina

Glu - glutamát

Gly - glycin

LDL - lipoproteiny o nízké hustotě

MRI - magnetická rezonance

NMDA – N-methyl-D-aspartát

P450c17 - 17 $\alpha$ -hydroxyláza/17,20 lyáza

P450scc - enzymatický komplex štěpící postranní řetězec cholesterolu

PCP - fencyklidin

PREG - pregnenolon

PREG-S - pregnenolon sulfát

PROG - progesteron

ROS - reaktivní formy kyslíku

RNS - reaktivní formy dusíku

# Obsah

1	Úvod .....	10
2	Neuroprotektivní látky .....	12
2.1	Vybrané skupiny neuroprotektivních látek.....	13
2.1.1	Antioxidanty .....	13
2.1.2	Antiapoptotické látky.....	14
2.1.3	Antagonisté AMPA receptorů .....	15
2.1.4	Blokátory $\text{Ca}^{2+}$ iontových kanálů .....	15
2.1.5	Blokátory $\text{Na}^{+}$ iontových kanálů .....	16
2.1.6	Agonisté a pozitivní modulátory $\text{GABA}_A$ receptorů .....	16
3	NMDA antagonismus .....	17
3.1	Struktura NMDA receptoru .....	17
3.2	Aktivace NMDA receptoru .....	19
3.3	Antagonisté NMDA receptoru .....	19
3.3.1	Kompetitivní antagonisté .....	19
3.3.2	Antagonisté glycinového vazebného místa .....	20
3.3.3	Nekompetitivní antagonisté .....	21
3.3.4	Unkompetitivní antagonisté.....	22
4	Neurosteroidy.....	24
4.1	Steroidy .....	24
4.2	Neurosteroidy a jejich syntéza.....	25
4.3	Účinky neurosteroidů na vybrané neurotransmiterové receptory .....	27
4.3.1	Význam NMDA receptorů a neurosteroidů pro terapeutické účely....	27
4.3.2	$\text{GABA}_A$ receptory .....	29
5	Cévní mozkové příhody a animální modely ischemického poškození mozku .....	30
5.1	Typy cévních mozkových příhod .....	31
5.1.1	Hemoragické cévní mozkové příhody .....	31
5.1.2	Ischemické cévní mozkové příhody .....	31
5.2	Patofyziologie mozkové tkáně podléhající ischemii .....	33
5.2.1	Excitotoxicita.....	34
5.2.2	Oxidační stres.....	35
5.3	Cévní zásobenění mozku .....	36



5.4	Animální modely ischemického poškození mozku .....	37
5.4.1	Vybrané modely fokální mozkové ischemie.....	37
5.4.2	Vybrané modely globální ischemie.....	39
6	Cíle práce.....	40
7	Materiál a metody .....	41
7.1	Použitá zvířata.....	41
7.2	Použité chemikálie a léčiva.....	41
7.3	Použité přístroje a vybavení .....	42
7.4	Metodické postupy .....	42
7.4.1	Popis operačních výkonů.....	42
7.4.2	Behaviorální testy.....	46
7.4.3	Statistické vyhodnocení .....	48
8	Výsledky.....	49
8.1	Experiment 1 - Vliv systémového podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok .....	49
8.2	Experiment 2 – Vliv systémového podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu na globální ischemické poškození mozku.....	51
8.2.1	Přežívání .....	51
8.2.2	MWM 7 dní po ischemii.....	51
8.2.3	AAPA 14 dní po ischemii.....	53
8.2.4	MWM měsíc po ischemii .....	56
8.2.5	AAPA měsíc a týden po ischemii.....	57
9	Diskuze .....	61
10	Závěr .....	66
11	Seznam literatury .....	67

# 1 Úvod

Mozek je organizačním centrem nervového systému obratlovců (CNS). Podílí se na řízení kognitivních schopností např. tvorba a uchování vzpomínek, koordinace motorických dovedností, porozumění řeči atd. Tyto a mnohé další vlastnosti bývají negativně ovlivněny např. při cévních mozkových příhodách následkem ischemicko-reperfuzního poškození [1].

Neustále se zvyšuje počet lidí trpících cévními mozkovými příhodami, proto se sočasný výzkum zaměřil na vývoj tzv. neuroprotektivních látek, které by měly ochranný efekt na nervovou tkáň při výše zmíněných událostech. Neuroprotektanty působí pomocí řady různorodých mechanismů, např. zmírňují následky excitotoxického poškození, snižují koncentraci reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS), zabraňují buněčné smrti, zvyšují saturaci kyslíku, dostupnost glukózy a regionální krevní průtok v mozku [2].

Jedním z možných míst účinku neuroprotektivních látek jsou glutamátergní receptory NMDA (N-methyl-D-aptát) typu. Tyto receptory jsou exprimované ve většině mozkových struktur a jsou esenciální v mnoha fyziologických procesech. Dále jsou NMDA receptory významné při patofyziologických stavech, kdy nadměrná jejich aktivace vysokou koncentrací Glu způsobí narušení mozkové tkáně. Preklinické studie ukázaly značný terapeutický potenciál NMDA antagonistů. Z klinického hlediska je jejich léčebných efekt omezený díky mnoha vedlejším účinkům od drobného zhoršení motorických funkcí až po psychomimetické projevy [3].

V 80. letech minulého století byly objeveny steroidní látky syntetizované *de novo* v centrální a periferní nervové soustavě [4]. Tyto látky byly nazvány neurosteroidy a interagují mimo jiné s NMDA receptory. Mezi neurosteroidy patří  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon sulfát (20-oxo- $5\beta$ -pregnan- $3\alpha$ -yl sulfát,  $3\alpha5\beta$ P-S), který selektivně působí use-dependentním způsobem na aktivní NMDA receptory [5]. Na základě této skutečnosti lze předpokládat, že aplikace neurosteroidů by mohla vést k prevenci excitotoxického poškození. Díky těmto vlastnostem jsou  $3\alpha5\beta$ P-S a jeho deriváty zkoumány z hlediska léčby CNS.

V CNS je enzymaticky udržována rovnováha mezi 3-hydroxy neurosteroidy a jejich sulfatovanými estery. K hydrolýze sulfatovaných esterů dochází na 3C pozici A kruhu steroidního skeletu [6].  $3\alpha5\beta\text{P-S}$  prochází hematoencefalickou bariérou pouze v malém množství [7]. Podání této molekuly by díky její hydrolyzaci nevedlo k její zvýšené koncentraci v mozku a nemělo by žádný medicínsky významný účinek [8]. Proto byl zahájen vývoj nových syntetických neuroaktivních steroidů odvozených od  $3\alpha5\beta\text{P-S}$ . V této práci byl testován derivát  $3\alpha5\beta\text{P-S}$   $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-L-glutamyl-1-ester,  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ ). Syntéza byla provedena v laboratoři oddělení Neuroprotektiv v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie Věd ČR.  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  nepodléhá rychlé hydrolýze a prochází hematoencefalickou bariérou [9]. Tato diplomová práce je zaměřena na preklinické testování vlivu  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  na základní fyziologické funkce a hledání vhodného animálního modelu globálního ischemického poškození mozku pro zjištění případných neuroprotektivních účinků  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ .

## 2 Neuroprotektivní látky

Neuroprotektivní látky jsou molekuly pomáhající předcházet či limitovat porušení integrity mozku a míchy způsobené iktem, neurodegenerativními onemocněními, traumatem apod. Chrání buňky nervového systému před jejich smrtí inhibicí jedné nebo více drah v patofyziologickém procesu [10]. Hlavními kritérii pro úspěšnou neuroprotektivní látku je schopnost tolerance organismu terapeutické dávky bez vážných vedlejších účinků, prostupnost přes hematoencefalickou bariéru, a účinnost neuroprotektantu, která musí být demonstrována na platných animálních modelech poškození CNS a později v klinických zkouškách [11].

Neuroprotektace CNS existuje ve dvou základních formách, ve formě akutní a chronické. Akutní neuroprotektace se uplatňuje po úrazech či náhlém iktu, v těchto případech neuroprotektivní látka musí téměř okamžitě cíleně účinkovat. Chronicky neuroprotektivní látky jsou nezbytné při neurodegenerativních chorobách, jejich hlavními vlastnostmi jsou zejména nekomplikované orální podání, slučitelnost s jinými farmaky a minimální vedlejší účinky. Neuroprotektanty mohou být endogenní povahy či exogenní molekuly s neuroprotektivním účinkem, které se v těle přirozeně nevyskytují. Do první skupiny patří např. neurotrofické faktory či antioxidanty. K druhému okruhu látek řadíme molekuly připravené synteticky. Tyto látky jsou většinou úspěšné v animálních modelech, ale v pozdějších klinických testech jsou jejich výsledky velmi rozporuplné např. MK-801 [2].

Příčiny neúspěchu neuroprotektivních látek v klinických zkouškách mohou být různé. Nejčastěji to však bývá díky přirozeným limitům preklinických studií. U zvířat zúčastňujících se experimentu nejsou většinou sledovány základní fyziologické parametry např. teplota, krevní tlak či saturace kyslíku aj., které ovlivňují výsledek. Další komplikací je zahrnutí mladých zdravých zvířat do experimentu na jeho počátku. Tato zvířata nemohou reprezentovat typickou skupinu pacientů s onemocněním. Léčba zvířat probíhá okamžitě po akutní rizikové události, což je u pacientů vyloučeno. Velkým problémem animálních modelů je podávání vysokých dávek neuroprotektantů.

Tyto vysoké koncentrace mohou vyvolat behaviorální nebo systematické vedlejší efekty nezjistitelné u zvířat, které jsou nepřipustné u lidských pacientů [12]. Nejvíce závažným faktem je přítomnost přirozených rozdílů mezi CNS člověka a zvířat. Díky těmto skutečnostem navrhla společnost Stroke Therapy Academic Industry Roundtable následující doporučení pro preklinické testování neuroprotektivních látek chránících CNS proti ischemicko-reperfuznímu poškození. Důležitým bodem je důkaz vstupu neuroprotektivní látky do cílového orgánu tj. mozku a s tím související její dobrá vstřebatelnost v gastrointestinálním traktu. Účinnost látky by měla být prokázána histologicky i pomocí behaviorálních testů bezprostředně po iktu i po delším časovém úseku nezávisle ve dvou laboratořích používajících odlišné modely. V neposlední řadě by experiment měl na začátku probíhat na zdravých mladých potkaních samcích a v případě pozitivních výsledků by měl pokračovat na samicích a starších zvířatech. Dodržování těchto zásad vede k selekci neuroprotektivních látek již během preklinického výzkumu a snížení rizika pro lidské pacienty [13].

## 2.1 Vybrané skupiny neuroprotektivních látek

### 2.1.1 Antioxidanty

Během oxidačního stresu je zvýšena produkce neurotoxických ROS a RNS. Antioxidanty redukují tyto velmi reaktivní částice na méně reaktivní a tím chrání nervové buňky před poškozením jejich lipidických membrán, DNA a proteinů [14].

Neenzymatický antioxidant  $\alpha$ -tokoferol (vitamín E) chrání nervové buňky před destrukcí membrán způsobenou peroxidací lipidů. Tato ochrana je zprostředkována reakcí  $\alpha$ -tokoferolu s lipoperoxidovým radikálem, jenž je tímto transformován na lipidický hydroperoxid, který je dále zpracováván glutathionperoxidázami. Příznivé účinky  $\alpha$ -tokoferolu byly zaznamenány v pokusech s kulturami buněk striata *in vitro* [15] a také při jeho podání

pacientům s Alzheimerovou chorobou, kdy došlo ke zpomalení průběhu tohoto závažného onemocnění [16].

Příkladem antioxidantu testovaného na pacientech s cévní mozkovou příhodou je Ebselen. Tato látka obsahující Se má glutathionperoxidázovou aktivitu tzn. redukuje lipidické hydroperoxidy na  $H_2O$  a příslušné alkoholy. Tímto navazuje na reakci  $\alpha$ -tokoferolu. V klinické studii byl pacientům injikován roztok Ebselenu do 48h po iktu po dobu 2 týdnů. Největší zlepšení stavu vykazovali pacienti, jimž byl roztok podán do 24h. S opožděující se dobou aplikace roztoku byly výsledky méně uspokojivé [17].

## 2.1.2 Antiapoptotické látky

Při omezení průtoku krve mozkovými cévami dochází k nekróze nervových buněk v ischemickém jádře, přičemž kolem tohoto místa vzniká tzv. penumbrální oblast. Zde je krevní tok omezen, transport iontů narušen a buněčný metabolismus zachován na úrovni dostačující pouze ke krátkodobému přežití [18]. Antiapoptoticky působící neuroprotektivní látky inhibují signální dráhy vedoucí k apoptóze buněk v penumbrální oblasti. Umožňují ostatním neuroprotektantům obnovit lokální homeostázu a funkčnost tkáně. Komplikací antiapoptotických látek je jejich velká molekulová hmotnost. Špatně prochází přes hematoencefalickou bariéru a u animálních modelů ischemie musí být zaváděny přímo do mozku [12].

FK506 je používán jako imunosupresivum při orgánových transplantacích. Výsledky použití FK506 v experimentálních animálních modelech mozkové ischemie byly slibné, avšak při jeho intravenózním podání pacientům nedošlo ke zmenšení oblasti mozku zasažené ischemickým poškozením [19].

### 2.1.3 Antagonisté AMPA receptorů

Glutamátergní receptory AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát) typu přispívají k excitotoxickému poškození a v mozkové tkáni podléhající ischemii dochází k upregulaci AMPA receptorů [20].

Nejstudovanějším antagonistou AMPA receptorů z hlediska ischemicko-reperfuzního poškození byla látka NBQX. U něj se vyskytovaly rozporuplné výsledky z animálních modelů. Při provedení permanentní okluze *arteria cerebra media* potkana žádná z podaných koncentrací NBQX neredukovala rozsah infarktu a nezlepšovala kognitivní funkce potkana v behaviorálních testech. Později byla prokázána nefrotoxicita této látky, způsobená její špatnou solubilitou ve vodě. Tento fakt znemožnil její postup v klinických zkouškách [21].

Vývoj této skupiny látek byl následován syntetickou molekulou YM872, která je ve vodě velmi dobře rozpustná. YM872 je kompetitivní antagonist AMPA receptorů. Pro ověření jeho neuroprotektivního vlivu byl také použit model permanentní okluze *arteria cerebra media* u potkana. Po intravenózní infuzi YM872 byla prokázána redukce rozsahu infarktového ložiska. Měření probíhalo 24h a 1 týden po ischemii. Po aplikaci tohoto neuroprotektantu nebyly zjištěny žádné behaviorální abnormality či nefrotoxicita [22].

### 2.1.4 Blokátory $\text{Ca}^{2+}$ iontových kanálů

Za fyziologických podmínek je v buňce udržována nízká koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . Při ischemicko-reperfuzním poškození dochází k vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a následné aktivaci mnoha enzymů např. syntáz oxidu dusnatého, lipáz, proteáz či endonukleáz. Následkem těchto kroků je aktivace signálních drah směřujících k apoptóze či nekróze buňky. Blokace vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  je možností, jak excitotoxické poškození zmírnit. Komplikací tohoto terapeutického přístupu je skutečnost, že v buňce se vyskytuje mnoho zdrojů  $\text{Ca}^{2+}$ . Klinické zkoušky blokátorů  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů mají většinou negativní výsledek. Např. Nimodipin, který blokuje dihydropiridinový  $\text{Ca}^{2+}$  kanál, který byl původně vyvinut na snížení

krevního tlaku a posléze testován jako neuroprotektivum. Na lidských pacientech její neuroprotektivní vliv prokázán nebyl [23].

Z hlediska působení  $\text{Ca}^{2+}$  se zdá být nejdůležitějším cílem neuroprotektivních látek  $\omega$ -agatoxin IVA-senzitivní  $\text{Ca}^{2+}$  kanál, který je ovlivňován Glu. Sloučenina  $\alpha$ -eudesmol izolovaná z rostliny *Juniperus virginiana* inhibuje výše zmíněný kanál. V této souvislosti byl ověřován vliv intracerebroventrikulárního podání  $\alpha$ -eudesmolu na edém mozku a rozsah ischemického ložiska. *Arteria cerebra media* potkana byla podvázána po dobu 1h. Měření dosažených výsledků bylo prováděno 24h po reperfuzi. Experimentálně bylo potvrzeno, že  $\alpha$ -eudesmol snižuje obsah vody v postischemickém mozku, čímž se zmenšil jeho edém. Dále byl menší i rozsah oblasti mozkové tkáně zasažené ischemií [24].

### 2.1.5 Blokátory $\text{Na}^+$ iontových kanálů

Látky, které blokují  $\text{Na}^+$  iontové kanály, nepřímo inhibují uvolnění excitotoxického Glu. Stejně jako u většiny neuroprotektivních látek, jsou blokátory  $\text{Na}^+$  iontových kanálů účinné v animálních modelech, ale v klinických zkouškách nevykazují signifikantní neuroprotektivní účinnost [12].

Příkladem takové molekuly je Sipatrigin, který byl v dřívějších preklinických testech úspěšný. Během klinické studie byl podáván intravenózně pacientům s diagnostikovaným iktem. Pacienti byli vyšetřováni 3 dny a 3 měsíce po podání. Velká část pacientů však studii nemohla dokončit díky vážným vedlejším efektům. U 16 z 21 pacientů se vyskytovala nervozita, zmatenost a v neposlední řadě také halucinace [25].

### 2.1.6 Agonisté a pozitivní modulátory $\text{GABA}_A$ receptorů

$\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmitter v mozku, po jejím navázání na  $\text{GABA}$  receptor je inhibiční efekt zprostředkován



otevřením  $\text{Cl}^-$  kanálu uvnitř receptoru a ionty  $\text{Cl}^-$  vtékají do buňky. Neuron se takto hyperpolarizuje, čímž se minimalizuje výlev Glu. Agonisté a pozitivní alosterické modulátory  $\text{GABA}_A$  receptoru by proto mohly mít vliv na následné excitotoxické poškození [12].

Z hlediska ischemicko-reperfuzního poškození byl nadějným pozitivním modulátorem  $\text{GABA}_A$  receptoru např. Clomethiazol. Experimenty probíhající na potkaním kortexu *in vitro* přinesly slibné výsledky. Při simulaci akutní ischemie aplikace clomethiazolu snížila výlev Glu [26]. Při klinických zkouškách zahrnujících 1198 pacientů s akutním iktem však nabyt pozorován žádný rozdíl mezi pacienty, jimž byl podán clomethiazol a pacienty s placebem [27].

### 3 NMDA antagonismus

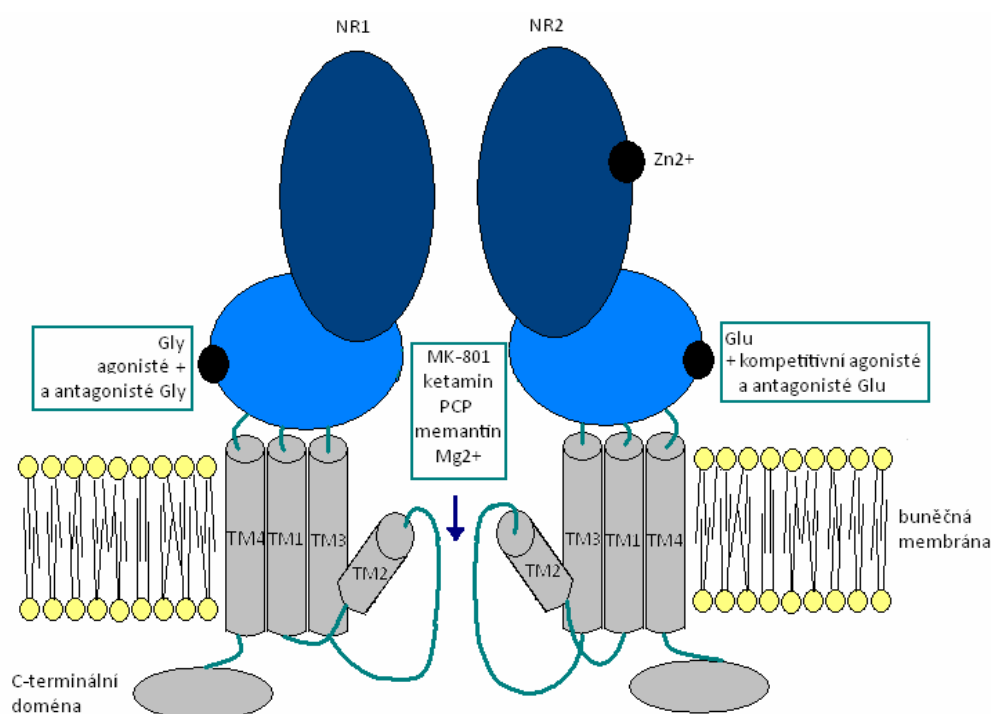
Jelikož NMDA receptory jsou v mozku nejrozšířenější, jejich význam pro správné fyziologické funkce je obrovský. Klíčové jsou v mechanismech nezbytných pro synaptickou plasticitu, a to dlouhodobou potenciaci a dlouhodobou depresi, správný vývoj mozku atd [28]. Dále je nezpochybnitelná jejich důležitost v patofyziologickém procesu excitotoxicity, kdy nadměrnou aktivací NMDA receptorů dochází k porušení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Právě vysoká vodivost pro  $\text{Ca}^{2+}$  je pro NMDA receptory typická [29]. Excitotoxické poškození se vyskytuje zejména při ischemických stavech, neurodegenerativních onemocněních a duševních poruchách. Současným cílem farmakologického výzkumu je najít neuroprotektivní látky schopné ovlivňovat NMDA receptory a tím předejít jinak nevratnému poškození CNS způsobené excitocitou Glu.

#### 3.1 Struktura NMDA receptoru

NMDA receptory jsou iontové kanály, jimiž po jejich aktivaci protékají ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  do vnitřku buňky a  $\text{K}^+$  z buněčného prostoru ven. Nativně se

vyskytují jako heterotetramery složené z 3 typů podjednotek zahrnujících NR1, NR2 a NR3 [30]. Podjednotka NR1 existuje celkem v 8 izoformách, NR2 může být syntetizována podle 4 různých genů, (NR2A až NR2D), méně častá NR3 podjednotka se nachází ve variantách NR3A či NR3B. Homotetramer NMDA receptoru většinou obsahuje dvě NR1 a dvě NR2. NR3 může nahrazovat jednu z NR2 podjednotek. Z terapeutického hlediska je složení receptoru velmi důležité, jelikož se od něj odvíjí biofyzikální a farmakologické vlastnosti komplexu. Topologie všech podjednotek je shodná. N-konec proteinu je na extracelulární straně, zatímco C-konec je orientován intracelulárně. Do membrány jsou integrovány 3 domény TM1, TM3 a TM4. Doména TM2 je intracelulární pohyblivá část vytvářející iontově selektivní pór kanálu receptoru [31].

Podjednotkové složení a některá vazebná místa NMDA receptoru jsou schematicky znázorněna na obr. 1.



Obr. 1: Schematické znázornění podjednotkového složení a některých vazebných míst na NMDA receptoru. Transmembránové domény TM1, TM3, TM4 a intracelulární pohyblivá klička TM2. Podjednotky NR1 a NR2. Antagonisté MK-801, ketamin, PCP (fencyklidin) a memantin. V nativním stavu se NMDA receptor vyskytuje jako heterotetramer. Upraveno podle [32].

## 3.2 Aktivace NMDA receptoru

Pro aktivaci NMDA heterotetramerního receptoru je nutné navázání 2 koagonistů, tzn. dvou molekul Glu na NR2 či NR3 a dvou molekul Gly na NR1 podjednotku. Dále je nepostradatelná depolarizace membrány neuronu, který má na svém povrchu NMDA receptory. Během klidového membránového potenciálu je iontový kanál receptoru blokován ionty  $Mg^{2+}$ , které disociují při již zmíněné depolarizaci, čímž umožní vtok iontům  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  a  $K^{+}$  [33]. Mimo vazebných míst pro koagonisty se na povrchu receptoru nachází i další vazebná místa pro jiné ligandy např. pro  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $H^{+}$ , polyaminy, blokátory kanálu či neurosteroidy. Existence mnoha vazebných míst je předpokladem pro farmakologické zásahy [31].

## 3.3 Antagonisté NMDA receptoru

Na vazebná místa receptoru působí dva typy látek, agonisté a antagonisté. Agonisté po svém navázání vyvolají konformační změnu, která je následována biologickou odpovědí. Antagonisté po obsazení receptoru žádnou odpověď sami o sobě nevyvolávají. Jsou to látky s afinitou ke svému vazebnému místu, bez vnitřní aktivity vzhledem k receptoru. Dále se na receptoru nacházejí tzv. modulační místa zodpovídající za změnu aktivity receptoru pomocí alosterických mechanismů [31].

Z hlediska schopnosti a místa navázání lze antagonisty dělit na kompetitivní antagonisty, antagonisty Gly vazebného místa, nekompetitivní antagonisty a unkompetitivní antagonisty. Z pohledu biologických účinků se jednotlivé skupiny liší vzhledem ke svým vlivům na chování jedince a schopností indukce nežádoucích účinků [31].

### 3.3.1 Kompetitivní antagonisté

Kompetitivní antagonisté představují látky vázající se na stejné vazebné místo jako agonista. Jejich výsledkem je zabránění nebo snížení míry aktivace

receptoru agonistou. Inhibiční efekt je dán poměrem koncentrací kompetitivního antagonisty vůči agonistovi. V případě NMDA receptoru jako kompetitivní antagonisty označujeme látky obsazující vazebné místo Glu. Díky mechanismu jejich působení nejsou využitelné jako neuroprotektivní léčiva. V lokálních oblastech mozku, kde dochází k patofyziologickému procesu excitotoxicity jsou vytlačeny nadbytkem uvolňovaného Glu a naopak v nepostižených místech brání správné funkci NMDA receptorů [34].

Mezi kompetitivní antagonisty NMDA receptoru patří např. látka Seflotel (CGS-19755), u něhož byly prokázány neuroprotektivní vlastnosti *in vivo*, avšak v klinických zkouškách tyto skutečnosti potvrzeny nebyly. Během nich byl Seflotel spolu s placebem podáván pacientům s iktem. Po pozdějším monitorování velikosti ischemických lézí pomocí počítačové tomografie (CT) nebyly nalezeny žádné rozdíly v rozsáhlosti lézí mezi pacienty s placebem a pacienty, jimž byl podáván Seflotel. Dále byla pozorována větší časná mortalita u skupiny pacientů se Seflotelem [35].

### 3.3.2 Antagonisté glycinového vazebného místa

V mozku se nalézají celkem dva typy vazebných míst pro Gly, na glycinových receptorech a na NMDA receptorech. Tato vazebná místa nejsou identická. Glycinové receptory vyskytující se primárně v mozkovém kmeni a páteřní míše obsahují glycin-A vazebné místo, jehož selektivním antagonistou je strychnin. Na glutamátových receptorech se nalézá glycin-B vazebné místo insenzitivní vůči strychninu. Antagonisté Gly vazebného místa nevyvolávají psychotomimetické příznaky a je zkoumán jejich terapeutický potenciál vůči cévním mozkovým příhodám, Alzheimerově chorobě, Parkinsonově chorobě, epilepsii či chronické bolesti [36].

Mezi látky procházející klinickým testováním z hlediska léčby iktu patří GV150526. V animálních modelech ischemie byl úspěšný a vykazoval neurotektivní potenciál. Při jeho podání lidským pacientům však žádný benefit prokázán nebyl [37].

### 3.3.3 Nekompetitivní antagonisté

Tyto látky mimikují účinek  $Mg^{2+}$  uvnitř iontového kanálu. Po depolarizaci membrány na rozdíl od  $Mg^{2+}$  neopustí lumen kanálu, čímž blokují průchod iontů. Jsou tedy stejně efektivní při jakékoli koncentraci agonisty [34]. Nejznámějšími nekompetitivními antagonisty jsou disociativní anestetika fencyklidin (PCP), ketamin a MK-801 (dizocilpin), jejichž vazebné místo se nachází uvnitř iontového kanálu [38].

PCP je látka patřící do skupiny sloučenin arylcyklohexyaminů. Tyto molekuly byly původně syntetizovány jako anestetika v 60. letech 20. století. Pacienti, kterým byl podán PCP, po operaci trpěli halucinacemi, paranoiou, poruchami řeči a kognitivním deficitem. Vykazovali příznaky chování podobné schizofrenii [39]. Díky těmto skutečnostem začal být PCP zneužíván narkomany, kteří mu hovorově říkají „andělský prach“. U experimentálních zvířat PCP vyvolává zhoršení sociální interakce [40] či kognitivní deficit [41]. Struktura PCP je znázorněna na obr. 2 a).

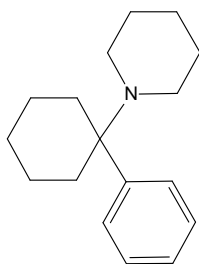
Podobně jako PCP působí veterinárně i humánně používaný ketamin. Po jeho akutním užití v subanestetické dávce dochází též k projevům některých příznaků schizofrenie. Spolu s PCP slouží k modelování této závažné nemoci na laboratorních zvířatech [42]. Na druhou stranu při použití velice nízké koncentrace ketaminu byly prokázány jeho antidepresivní účinky. K zlepšení stavu pacientů s depresivní poruchou docházelo pár hodin po intravenózní infuzi. Tyto výsledky potvrzují značný antidepresivní potenciál ketaminu. Účinky ostatních používaných antidepresiv se projevují v řádech týdnů až měsíců [43]. Struktura ketaminu je znázorněna na obr. 2 b).

Nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů je také MK-801. Tato sloučenina má velmi vysokou afinitu k místu vázající PCP, tudíž je velmi silným a dlouhodobým blokátorem iontového kanálu [44]. Ačkoli je velmi silný antikonvulzant a působí jako neuroprotektivum při ischemickém poškození [45], v klinické praxi je jeho použití nepřípustné díky neurotoxickým a psychotomimetickým účinkům. Zvířata, kterým byl aplikován, vykazují známky

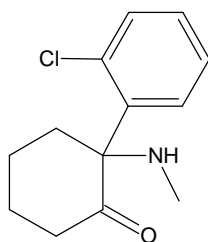
hyperlokomoce, stereotypního chování a zhoršení paměti [46]. Struktura MK-801 je znázorněna na obr. 2 c).

Použití nekompetitivních antagonistů vede k velmi závažným vedlejším účinkům. Jejich podkladem může být indukce psychóz a případná následná neurodegenerace. Těchto okolností se v současném výzkumu využívá k modelování psychotických onemocnění na laboratorních zvířatech. Některé behaviorální příznaky po aplikaci nekompetitivních antagonistů mohou být zmírněny běžnými antipsychotiky. Tato skutečnost pak dokazuje validitu příslušného animálního modelu psychózy [42].

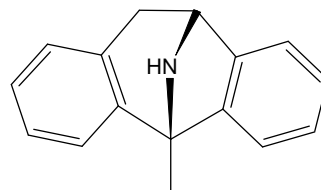
a) PCP



b) ketamin



c) MK-801

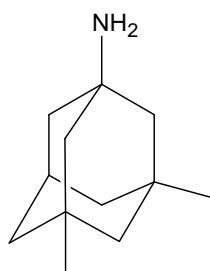


Obr. 2: Chemické struktury a) fencyklidin (PCP), b) ketamin, c) MK-801. Upraveno podle [47,48].

### 3.3.4 Unkompetitivní antagonisté

Kompetitivní i nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru jsou kvůli jejich následným efektům na organismus z terapeutického hlediska nevhodné. Proto by bylo v klinické praxi patologických stavů vhodné používat látky působící pouze na aktivní NMDA receptory. Klinicky tolerovatelné neuroprotektivní látky by měly vykazovat nízkou afinitu k receptoru, aby nedocházelo k ovlivňování nepostižených oblastí mozku. Unkompetitivní antagonisté působí pouze na agonistou aktivované receptory. Jejich inhibiční efekt je tedy dependentní na koncentraci agonisty a v případě NMDA receptoru i na membránovém potenciálu [34]. Do této skupiny látek patří např. derivát

antivirotika amantadinu memantin. Na rozdíl od MK-801 je memantin schopen blokovat NMDA receptor při velmi nízkých  $\mu\text{M}$  koncentracích, a zároveň rychle opouštět iontový kanál díky své nízké afinitě [49]. Jeho vazebné místo je blízko vazebného místa pro  $\text{Mg}^{2+}$  [50]. Chemická struktura memantinu je znázorněna na obr. 3. Neuroprotektivní účinek memantinu proti velkému výlevu Glu byl mimo jiné prokázán na animálním modelu ischemie. Potkanům byly podvázány *arteriae carotis communis* a následně byli umístěni do 8% hypoxie. Po iktu jim byl podán memantin v dávce 20mg/kg a pak 1mg/kg po 12 hodinovém intervalu. Po následném snímání v magnetické rezonanci (MRI) byly pozorovány menší léze u potkanů, kterým byl aplikován s memantinem [49]. Memantin je používán pro pozitivní ovlivnění kognitivních funkcí pacientů s Alzheimerovou chorobou, kdy jeho podání zpomaluje progresi jejich kognitivního deficitu. Jedná se v současnosti o jediný schválený preparát k léčbě Alzheimerovy choroby [30].

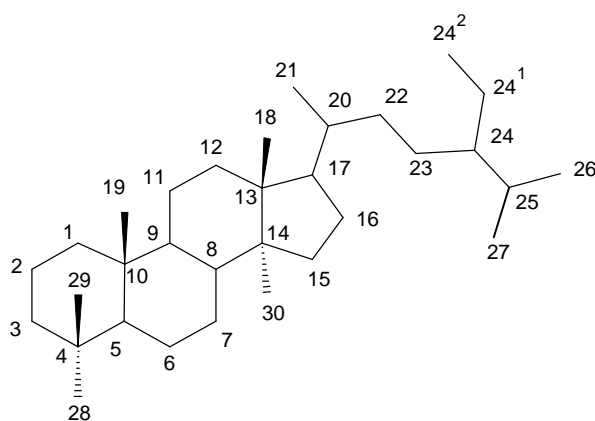


Obr. 3: Chemická struktura memantinu. Upraveno podle [51].

## 4 Neurosteroidy

### 4.1 Steroidy

Steroidy jsou v organismu přirozeně se vyskytující látky nepolární povahy složené ze tří cyklohexanových kruhů a jednoho cyklopentanového. Vyskytují se v prokaryotech i eukaryotech. Mají vliv na mnoho fyziologických procesů. Mezi biologicky nejvýznamnější steroidy patří např. cholesterol esenciální pro integritu buněčných membrán. Jeho chemická struktura je znázorněna na obr. 4. Významné jsou též steroidní hormony syntetizované endokrinními žlázami ovlivňující např. stresovou reakci, menstruační cyklus a v neposlední řadě také chování. Biologicky aktivními steroidy jsou dále žlučové kyseliny některé formy vitaminů aj.



Obr. 4: Chemická struktura cholesterolu. Upraveno podle [52].



## 4.2 Neurosteroidy a jejich syntéza

Termín neurosteroidy, poprvé použitý v roce 1987 Etrennem Baulieuem, označuje látky steroidní povahy syntetizované nebo metabolizované *de novo* v mozku z cholesterolu a dalších steroidních molekul transportovaných krví. Jejich syntéza v mozku byla potvrzena přítomností steroidních látek pregnenolonu ( $3\alpha$ ,  $5\beta$ -tetrahydroprogesteron, PREG), dehydroepiandrosteronu ( $3\beta$ -hydroxyandrost-5-en-17on, DHEA) a jejich sulfátů ve vysoké koncentraci i po provedení gonadektomie a andenalektomie [4]. Expres steroidogenních enzymů bývá ve vývoji mozku přísně regulována. Syntéza neurosteroidů má shodné body se syntézou steroidních hormonů v gonádách či nadledvinkách. V pozdějších fázích syntetické dráhy se vyskytují kroky specifické pro mozkovou tkáň. Základní kroky v syntéze steroidních látek a potažmo i neurosteroidů jsou zobrazeny na obr. 5.

Enzymy účastnící se syntézy neurosteroidů byly lokalizovány v mitochondriích glií a neuronů. Řada z nich patří do velké rodiny enzymů cytochromů P450. Syntéza neurosteroidů a steroidních hormonů začíná přenesením molekuly cholesterolu na vnitřní mitochondriální membránu, kde je následně zpracován enzymatickým komplexem štěpícím postranní řetězec cholesterolu (P450<sub>scc</sub>) a konvertován na PREG [53]. P450<sub>scc</sub> katalyzuje  $20\alpha$ -hydroxylaci,  $22$ -hydroxylaci a štěpení vazby mezi C20 a C22. V dospělém potkaním mozku je exprimována hlavně v kortexu, amygdale, hippokampu a bazálních gangliích [54].

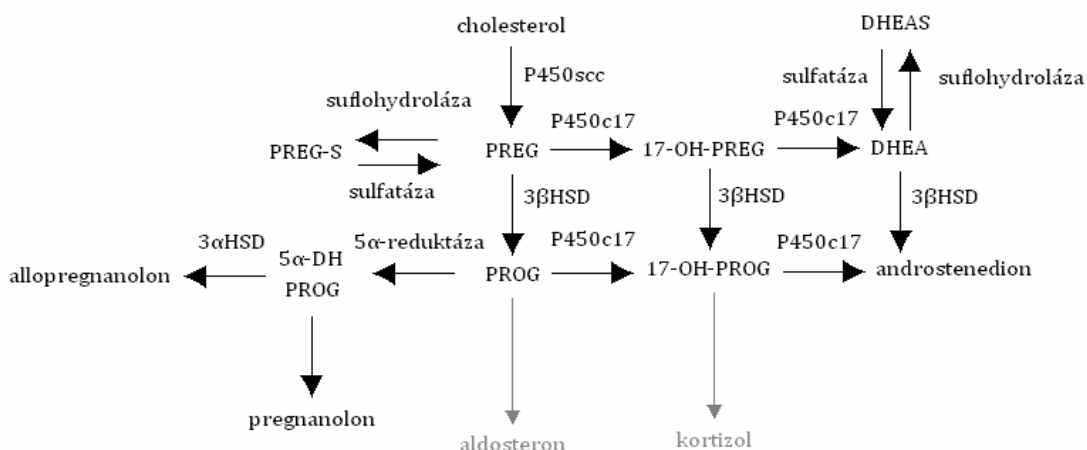
PREG je poté transformován enzymem  $3\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázou ( $3\beta$ -HSD) na progesteron (pregn-4-en-3, 20-dion, PROG). Dále  $3\beta$ -HSD může katalyzovat přeměnu 14-hydroxy-PREG na 17-hydroxy-PROG.  $3\beta$ -HSD tedy disponuje 3-dehydrogenázovou aktivitou a schopností izomerizovat dvojnou vazbu mezi uhlíky C5 a C6 v B kruhu na pozici C4 a C5 v A kruhu [55].

PREG i PROG mohou být dále metabolizovány pomocí  $17\alpha$ -hydroxylázy/17, 20 lyázy (P450<sub>c17</sub>). Z enzymatické dráhy, kterou iniciuje P450<sub>c17</sub> vznikají 17-hydroxy steroidy (17-hydroxy-PREG a 17-hydroxy-PROG),

ze kterých pak pomocí štěpení vazby mezi C17 a C20 vznikají DHEA a androstenedion [55].

Enzym P450c17 je klíčový pro steroidogenezi. Pozoruhodná je jeho regulace ve vývoji. V dospělém potkaním mozku P450c17 zatím nebyl objeven, jelikož jeho exprese v mozku mizí v prvním týdnu života potkana [56]. V periferních tkáních jeho syntéza stále přetrvává. Produkty P450c17 jsou do mozku pravděpodobně zanášeny krevním řečištěm, proto Baulieu mohl prokázat DHEA v mozku. DHEA je výchozí látkou pro syntézu androstenediolu, který je prekurzorovou molekulou pro vznik androgenů a estrogenů jako jsou např. testosteron a estradiol [55].

V mozku se vyskytují významné sulfotransferázy, které přenášejí sulfátovou skupinu  $\text{SO}_4^{2-}$  na steroidní molekuly. Tímto vznikají sulfátové estery steroidů např. dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS) či pregnenolon sulfát (20-oxo-pregn-5-en-3 $\alpha$ -yl sulfát, PREG-S), které ovlivňují řadu neurotransmiterových receptorů. Sulfátovou skupinu odjímá steroid sulfohydroláza [55].



Obr. 5: Schéma základních kroků v syntéze steroidních látek. PREG (pregnenolon), PREG-S (pregnenolon sulfát), 17-OH-PREG (17-hydroxy-pregnenolon), PROG (progesteron), 17-OH-PROG (17-hydroxy-progesteron), DHEA (dehydroepiandrosteron), DHEAS (dehydroepiandrosteron sulfát), 5 $\alpha$ -DH-PROG (5 $\alpha$ -dihydro-progesteron), P450scc (enzymový

komplex štěpící postranní řetězec cholesterolu), P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxyláza/17, 20 lyáza), 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza), 3 $\alpha$ HSD (3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenáza). Upraveno podle [55].

## 4.3 Účinky neurosteroidů na vybrané neurotransmiterové receptory

Steroidní hormony syntetizované endokrinními žlázami působí v buňce přes své intracelulární receptory nacházející se v buněčném jádře, kde regulují transkripci a následnou syntézu proteinů. Tento způsob regulace je velmi pomalý s dlouhodobým účinkem.

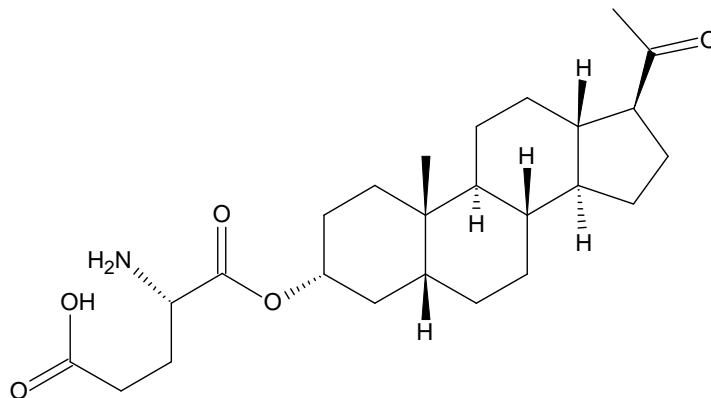
Naproti tomu neurosteroidy ovlivňují excitabilitu neuronů zejména velmi rychlým mechanismem. Působí především na NMDA, GABA<sub>A</sub> a opioidní receptory. Mechanismus jejich účinku spočívá v ovlivnění excitace nebo inhibice neuronu, na kterém se receptory nacházejí. Cílem následující části je popsat mechanismus a účinky působení neurosteroidů na NMDA receptory a GABA<sub>A</sub> receptory [57].

### 4.3.1 Význam NMDA receptorů a neurosteroidů pro terapeutické účely

Jak již bylo dříve řečeno, NMDA receptory jsou díky svému rozšíření a velkému významu v patogenezi významným terapeutickým cílem. Řada látek, které byly navrženy jako neuroprotektivní NMDA antagonisté, v klinickém výzkumu selhala díky nepřípustným vedlejším účinkům. Výjimkou je memantin.

Proto je nyní esenciální najít molekuly, které by působily na NMDA receptory, přičemž jejich použití by nevykazovalo psychotomimetické účinky a kognitivní či paměťové deficity. Mezi látky, které splňují tato kritéria, patří i neurosteroidy. Za fyziologických podmínek je velmi důležitá role neurosteroidů pro myelinizaci neuronů, růst axonů a dendritů, neuroprotektci a paměť [58].

Tzv. neuroaktivní steroidy jsou steroidní molekuly rychle modulující neurotransmitterové receptory, které nemusí být syntetizované v mozku. Do skupiny neuroaktivních steroidů patří synteticky připravené steroidní látky působící na nervovou tkáň [59]. Příkladem takovéto molekuly je námi testovaný  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ , jehož chemická struktura je znázorněna na obr. 6.



Obr. 6: Chemická struktura  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Upraveno podle [9].

#### 4.3.1.1 Působení neurosteroidů na NMDA receptory

Na NMDA receptorech byla testována řada neurosteroidů. Pro tuto práci jsou důležité pouze některé z nich, jejich působení zde popíši.

$3\alpha5\beta\text{P-S}$  je v savčím mozku přirozeně se vyskytující látka působící na NMDA, AMPA, či  $\text{GABA}_A$ . Na NMDA receptory má  $3\alpha5\beta\text{P-S}$  inhibiční účinek, který nezávisí na membránovém potenciálu. Jeho navázání je podmíněno aktivací receptoru agonistou. Z této skutečnosti se usuzuje, že  $3\alpha5\beta\text{P-S}$  je tzv. use-dependentní alosterický inhibitor NMDA receptoru. Schopnost  $3\alpha5\beta\text{P-S}$  působit inhibičně na NMDA receptor byla prokázána jeho aplikací na kulturu hipokampální neuronů, ve které následně došlo k 70% redukci proudu procházejícího přes NMDA receptory.  $3\alpha5\beta\text{P-S}$  snižuje frekvenci otevírání iontového kanálu NMDA receptoru [60]. Vazebné místo pro inhibiční neurosteroidy na NMDA receptoru zatím není známo, pravděpodobně se jedná o samostatné vazebné místo uvnitř membrány nebo na extracelulární straně receptoru [61].

Námi testovaný 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu je syntetický analog 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-S, který byl připraven v Ústavu Organické chemie a Biochemie Akademie věd České Republiky. Sulfátová skupina na C3 je zde nahrazena Glu. Jeho účinek na NMDA receptory je rovněž inhibiční, use-dependentní a nezávislý na transmembránovém potenciálu. Při intraperitoneálním podání prochází hematoencefalickou bariérou s maximální koncentrací v mozku po 60min od jeho aplikace. Zatím byly jeho neuroprotektivní účinky v naší laboratoři testovány na bilaterálních hipokampálních NMDA lézích, při nichž NMDA vyvolá excitotoxické léze v oblastech *gyrus dentatus* a CA1 – CA3. Podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu vedlo k redukci poškození hlavně u pyramidálních buněk a následnému zlepšení zvířat v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu, která bude popsána později v experimentální části [9]. Z těchto důvodů jsem se zaměřila na neuroprotektivní účinky 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu ve své diplomové práci.

PREG-S se také přirozeně vyskytuje v savčím mozku [62]. Od 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-S se liší pouze přítomností dvojné vazby na C3, přesto je jeho účinek na NMDA receptor zcela opačný. Po jeho aplikaci dochází k potenciaci NMDA receptorů pomocí zvyšování frekvence jejich otevření. Jeho působení je rovněž nezávislé na membránovém potenciálu [63, 64]. Vazebné místo pro potenciační neurosteroidy na NMDA receptoru zatím též není známé.

## 4.3.2 GABA<sub>A</sub> receptory

### 4.3.2.1 Struktura a farmakologie GABA<sub>A</sub> receptorů

GABA je hlavním inhibičním přenašečem v savčím mozku. GABA<sub>A</sub> je ionotropní neurotransmiterový receptor obsahující Cl<sup>-</sup> kanál ve svém vnitřku. Vtok Cl<sup>-</sup> do buňky vyvolá hyperpolarizaci buněčné membrány a s tím související inhibici následného synaptického přenosu. GABA<sub>A</sub> receptory jsou heteropentamery, v současnosti je známo 19 podjednotek ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3), nejčastější stechiometrické uspořádáním je 2 $\alpha$  : 2 $\beta$  : 1 $\gamma$  [65, 66]. Na GABA<sub>A</sub> receptoru se nachází mnoho vazebných míst pro farmakologicky

významné pozitivní alosterické modulátory např. benzadiozepinové vazebné místo, vazebné místo pro barbituráty, etanol, inhalační anestetika (enfluran) aj. Kompetitivními antagonisty GABA<sub>A</sub> receptoru jsou např. bikukulin a muscimol. Do blízkosti iontového kanálu pro Cl<sup>-</sup> ionty se váže např. pikrotoxin, který spolu s bikukulinem patří mezi silné konvulzanty [67].

#### 4.3.2.2 Působení neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> receptory

Bylo prokázáno, že stereoselektivní působení PROG vyvolává potenciaci GABA<sub>A</sub> receptoru [68]. Dále GABA<sub>A</sub> receptor potenciují allopregnanolon (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ), pregnanolon (3 $\alpha$ 5 $\beta$ ) či tetrahydroxydeoxykortikosteron (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC). Jejich pozitivní modulace GABA<sub>A</sub> receptoru spočívá v prodloužení doby otevření iontového kanálu pro Cl<sup>-</sup> ionty [69]. Naproti tomu sulfátové deriváty neurosteroidů např. PREG-S, DHEAS či 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-S působí na GABA<sub>A</sub> receptor inhibičně [70]. Přítomnost negativně nabitě skupiny na C3 pravděpodobně zesiluje inhibiční působení molekuly neurosteroidu na GABA<sub>A</sub> receptor stejně jako v případě NMDA receptoru. Inhibiční účinek PREG-S je nezávislý na membránovém potenciálu buňky, což naznačuje, že PREG-S nepůsobí jako blokátor Cl<sup>-</sup> kanálu [71].

Vazebná místa pro neurosteroidy nebyla zatím identifikována, výsledky současných experimentů však ukazují že neuroaktivní steroidy působí na odlišném místě, než agonista GABA a nepůsobí ani prostřednictvím jiných vazebných míst pro alosterické modulátory [70].

## 5 Cévní mozkové příhody a animální modely ischemického poškození mozku

Cévní mozková příhoda čili iktus je nejčastější akutní onemocnění nervového systému, které je způsobeno poruchou prokrvení mozkové tkáně. Zároveň je to druhá nejčastější příčina úmrtí ve vyspělých státech. Cévní mozkové příhody se dělí na ischemické a hemoragické [72].

## 5.1 Typy cévních mozkových příhod

### 5.1.1 Hemoragické cévní mozkové příhody

Hemoragické cévní mozkové příhody vznikají na podkladě krvácení do mozkových struktur v důsledku ruptury cévní stěny arterií. Příčina prasknutí cévní stěny může být např. trauma hlavy nebo arteriální hypertenze. Krvácení je zastaveno během několika minut koagulací. Kolagulum poté toxicky působí na okolní tkáň a stlačuje ji. Tím vzrůstá intrakraniální tlak a dochází k rozvoji mozkového edému. Velmi nebezpečné je subarachnoidální krvácení, které může vést k rychlé mozkové smrti [72].

### 5.1.2 Ischemické cévní mozkové příhody

Ischemické cévní mozkové příhody se dělí na fokální (ložiskové) a globální (celkové). Při fokálních ischemiích je redukován krevní tok pouze v určitém regionu mozkové tkáně, zatímco u globálních ischemií je omezen krevní tok ovlivňující celý mozek. Do fokálních cévních příhod patří aterosklerotické, trombotické a embolické cévní příhody. Mezi globální cévní příhody se řadí hypoxické, stagnační a anemické cévní příhody [72].

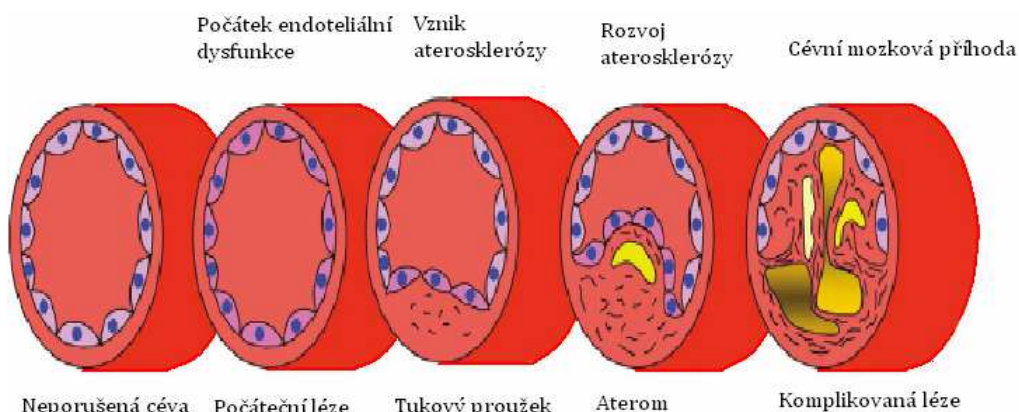
#### 5.1.2.1 Fokální ischemické cévní příhody a jejich příčiny

Ateroskleróza je chronický zánět cévní stěny, který vzniká v závislosti na endotelové dysfunkci, vyúsťuje v patologické defekty cévní stěny arterií a je podkladem většiny ischemických cévních mozkových příhod.

Endotelová dysfunkce je předstupněm pro vznik aterosklerotických lézí v mozkových arteriích. Endotelovou dysfunkcí nazýváme narušení homeostázy endotelu, která se projevuje vasokonstrikcí a trombogenezí. Všeobecně zastávaným názorem je, že endotelová dysfunkce je reversibilní děj. Původní

fyziologickou homeostázu endotelu může obnovit např. snížení hladiny cholesterolu a redukce váhy pacienta [73].

Do poškozeného endotelu cévní stěny nejprve proniknou lipoproteiny, zejména LDL (lipoproteiny o nízké hustotě), které jsou poté modifikovány vlivem oxidačního stresu. Oxidované LDL aktivují endotel, který poté produkuje adhezivní molekuly a zánětlivé cytokiny pro průnik monocytů. Ty se v cévní stěně transformují na makrofágy fagocytující oxidované LDL. Vlivem pohlcování oxidovaných LDL makrofágy diferencují v pěnové buňky, které nejsou schopny cévní stěnu opustit, a později zde podléhají apoptóze. Buněčná smrt má za následek vrácení oxidovaných LDL do lumen cévy a celý proces se neustále opakuje. Takto v cévě vzniká aterom, který má lipidové jádro složené z extracelulárně akumulovaných lipidů. Postupně dochází k proliferaci hladkých svalových buněk a zvýšené synthese extracelulární matrix, která vytvoří vazivové pouzdro na lipidovém jádře ateromu. V konečném stádiu aterosklerotické léze dochází ke krvácení do aterosklerotického plátu, kalcifikaci odumřelých buněk a trombóze. Při dlouhotrvající stenóze arterií dochází k tvorbě aneurismat, na jejichž povrchu hrozí nebezpečí ruptury a následného krvácení do mozkové tkáně [14]. Vývoj patologických změn v cévě od počáteční endotelové dysfunkce až ke komplikovaným aterosklerotickým lézím je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7: Postup patologických změn v cévní stěně mozkové cévy od endotelové dysfunkce až ke komplikovaným aterosklerotickým lézím. Žlutě jsou znázorněny oxidované LDL s pěnovými buňkami. Upraveno podle [73].



Trombotické cévní příhody velmi úzce souvisí s aterosklerotickými. Při dysfunkci endotelu dochází mimo jiné i k adhezi trombocytů na odkrytá kolagenní vlákna cévní stěny. Tímto vzniká fibrinové kolagulum neboli trombus, které se postupně rozrůstá, což může vést ke klinické manifestaci příznaků ischemie. Při embolických cévních příhodách tromby pochází z odlišných částí těla např. z arterií vedoucích ze srdce. Po jejich oddělení od původní cévní stěny jsou následně zaneseny krevním řečištěm do mozku, kde uzavřou průchod některé z arterií [72].

#### 5.1.2.2 Globální ischemické cévní příhody

Hypoxické cévní příhody vznikají v důsledku nedostatečného zásobování mozku kyslíkem, tento patofyziologický stav může přirozeně nastat např. při bronchopneumonii, výškové nemoci či spotřebování kyslíku v místnosti. Dále existují stagnační cévní příhody, při nichž je krev nedostatečně dodávána do tkání v důsledku zástavy srdce. Při anemických mozkových příhodách je příčinou ischemie mozku nedostatečný přenos kyslíku erytrocyty. Vzácným stavem je tzv. demand hypoxie, což je stav extrémní náročnosti nervové tkáně např. při status epilepticus [1, 72].

### 5.2 Patofyziologie mozkové tkáně podléhající ischemii

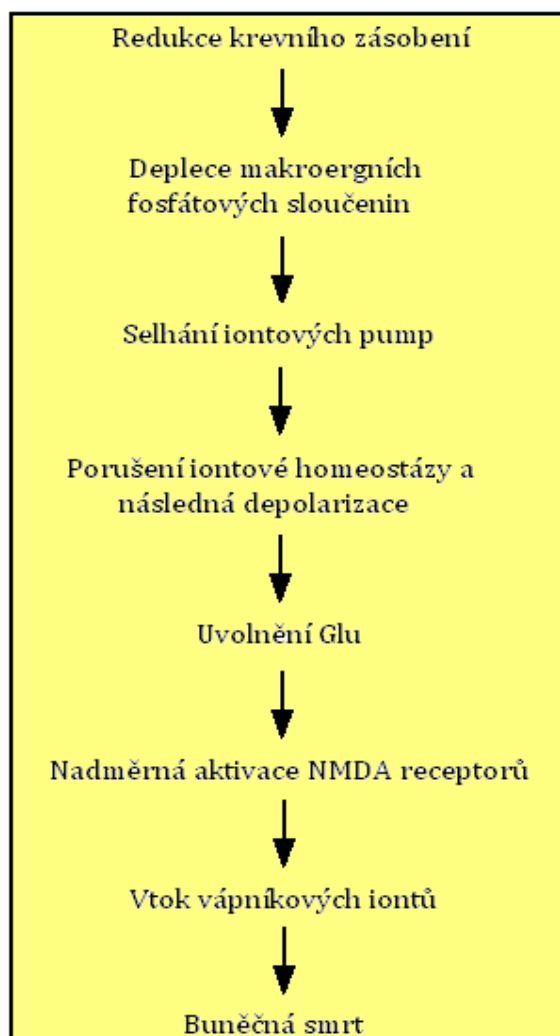
Oblast tkáně trpící ischemií se u člověka dělí na dvě části tzv. ischemické jádro a penumbrální (periiktrální) oblast. Ischemické jádro je populace buněk bezprostředně vystavená radikálnímu omezení krevního toku. Díky nenávratnému narušení buněčného metabolismu, během pár minut tyto buňky podléhají nekróze. Penumbrální oblast obklopující ischemické jádro si zachovává bazální metabolismus, poškození je zde reverzibilní a buňky mohou opět nabýt svou fyziologickou funkci či pokud se okolnosti nezmění, podléhají

apoptóze. Penumbrální oblast je z těchto důvodů terapeutickým cílem neuroprotektivních látek [1].

V regionu buněk trpících ischemií postupně dochází k několika patofyziologickým procesům, které mají za následek ultimátní poškození mozkové tkáně. Hlavními mechanismy ischemicko-reperfuzního poškození jsou excitotoxicita a oxidační stres [1].

### 5.2.1 Excitotoxicita

Teorie excitotoxicity byla poprvé navržena Olneyem v roce 1971 jako vysvětlení patofyziologických změn probíhajících v mozku po ischemii. Tyto změny jsou způsobeny uvolněním excitačních aminokyselin, zejména Glu a Asp. Při omezení průtoku krve mozkovou cévou dochází k sníženému množství kyslíku a úbytku sloučenin fosfátu s makroergními vazbami. Nedostatečné množství makroergních fosfátových sloučenin má za následek selhání iontových pump závislých na ATP. Toto vede k hromadění extracelulárního  $K^+$ , následné depolarizaci a uvolnění Glu do synaptické štěrbin. Zpětné vychytávání Glu je též závislé na ATP, takže zmíněný neurotransmitter není odčerpáván a může působit během ischemie na postsynaptické receptory neobvykle dlouho. Glu ovlivňuje zejména čtyři typy receptorů rozdělující se do dvou skupin, první skupinou jsou ionotropní receptory, mezi které řadíme NMDA, AMPA a kainátové receptory, druhou skupinu tvoří receptory metabotropní. Po navázání Glu na ionotropní receptory dojde ke zvýšení pravděpodobnosti otevření kationového kanálu uvnitř receptoru a následnému vtoku  $Na^+$  a  $Ca^{2+}$  do buňky a  $K^+$  z buňky. Zvýšená intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  je pro buňku toxická, jejím výsledkem je ovlivnění mnoha signálních kaskád, z nichž některé vedou k nekróze či apoptóze buňky. V případě nekrózy postižená buňka lyzuje, čímž uvolňuje další velké množství Glu a sekvence autodestruktivních událostí se opakují [1]. Schématické znázornění kroků probíhajících při excitotoxickém poškození je na obr. 8.



Obr. 8: Schématické znázornění kroků v buňce, které probíhají při excitotoxickém poškození. Upraveno podle [12].

## 5.2.2 Oxidační stres

Oxidační stres je označován jako nerovnováha mezi produkcí ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) a jejich odstraňováním neenzymatickými antioxidanty a antioxidačními enzymy. V organismu jsou ROS a RNS během ischemicko-reperfuzního poškození produkovány různými zdroji, nejvýznamnějšími z nich jsou mitochondriální dýchací řetězec, NADPH oxidáza, NO syntáza, xanthinoxidáza a v neposlední řadě cytochrom P450. Některé formy ROS a RNS jsou volné radikály tj. částice obsahující právě jeden nepárový elektron. Díky své velké nestabilitě a reaktivitě jsou schopny odjímat elektrony dalším molekulám, tímto je destabilizovat a následně poškozovat. Radikálové

formy ROS a RNS ničí buněčné makromolekuly zejména peroxidací membránových lipidů, inaktivací proteinů a mutací DNA. K největšímu poškození dochází po obnovení krevního toku tj. při reperfuzi, kdy se nahromaděné ROS a RNS náhle vyplaví a negativně působí na okolní tkáň. Buňka má proti těmto škodlivým účinkům ROS a RNS vyvinutý systém antioxidační ochrany, který transformuje ROS a RNS na méně reaktivní molekuly. K hlavním antioxidačním enzymům se řadí superoxiddismutasy, glutathionperoxidasy a katalasa. k neenzymatickým antioxidantům patří zejména kyselina askorbová,  $\alpha$ -tokoferol, glutation, kyselina močová a bilirubin [14].

## 5.3 Cévní zásobení mozku

Bilaterální *arteria carotis communis* zásobující hlavu a krk se větví *arteria carotis externa* a ve větší hloubce se nalézající *arteria carotis interna*. Ta spolu s *arteria basilaris* vznikající z *arteriae vertebrales* tvoří Willisův okruh. *Arteriae vertebrales* má potkan velmi dobře vyvinuté, proto modelování globální ischemie u potkana nestačí okluze *arteriae vertebrales* či *arteria carotis communis*, musí se buď uzavřít obě cévy či zákrok kombinovat s hypotenzí nebo hypoxií. Funkcí Willisova okruhu je vyrovnávání tepových vln z přírodních cév a rovnoměrné plnění tepen vycházejících z okruhu.

Z Willisova okruhu odstupují např. *arteria cerebri anterior*, *arteria cerebri media* a *arteria cerebri posterior*. *Arteria cerebri anterior* je konečná větev *arteria carotis interna* zásobuje čelní lalok a mediální část mozkových hemisfér. *Arteria cerebri media* zásobující povrchovou část hemisfér je nejsilnější větev *arteria carotis interna*. *Arteria cerebri posterior* prokrvuje okcipitální lalok a bázi laloku temporálního [74].

## 5.4 Animální modely ischemického poškození mozku

Použití vhodných animálních modelů je důležité k porozumění patofyziologie velmi komplexních onemocnění, mezi které bezesporu patří i cévní mozkové příhody. Nejčastěji používanými zvířaty jsou potkani a myši, ale používají se i králíci, pískomilné, a subhumánní primáti [75].

Modely cévních mozkových příhod se dělí na modely fokální ischemie a modely globální ischemie. U modelů fokální ischemie je cílem redukovat krevní tok v ohraničeném regionu mozku, zatímco modely globální ischemie mají redukovat krevní tok v celém mozku. Ve své práci jsem stručně popsala nejpoužívanější modely obou typů ischemického poškození [75].

### 5.4.1 Vybrané modely fokální mozkové ischemie

Nejpoužívanějšími modely fokální mozkové ischemie jsou mechanická okluze *arteria cerebri media*, modely přibližující stav organismu po embolii a endothelinové modely. Po fokální mozkové ischemii se vyskytují dvě fáze poškození, první fáze je okamžitá nekróza v ischemickém jádru, po které následuje sekundární poškození probíhající v penumbrální oblasti v řádech dnů [1].

#### 5.4.1.1 Mechanická okluze *arteria cerebri media*

Mechanická okluze *arteria cerebri media* se experimentálně provádí na jejím proximálním a distálním konci.

Okluze proximálního konce *arteria cerebri media* je nejčastěji používaným modelem ve výzkumu cévních mozkových příhod. Okluze se provádí pomocí silikonem obaleného šití v místě oddělení *arteria cerebri media* od *arteria carotis interna*. Okluze může být permanentní, či dočasná, kde kromě ischemického poškození dochází i k poškození reperfučnímu. Při krátketrvající

okluzi podléhají buněčné smrti neurony striata. Buňky přilehlého kortexu aktivují proapoptotické signální dráhy. Při dlouhotrvající okluzi dochází k mozkovým infarktům ve striatu i kortexu [75, 76].

Při okluzi distálního konce zvířata musí podstoupit kraniotomii, která může mít vedlejší efekty na pooperační stav zvířat. Někdy je distální okluze kombinována s permanentní ipsilaterální či dočasnou bilaterální okluzí *arteria carotis communis*. Ischemické poškození tkáně poté zasahuje frontální, parietální a temporální kortex [77, 78].

#### 5.4.1.2 Tromboembolické modely

Lidské cévní mozkové příhody jsou často způsobeny cévními tromby a emboliemi. Tento druh cévních mozkových příhod bývá modelován pomocí injekčního podání makro či mikročastic. Tyto částice mohou být polyethylenové kuličky o velikosti 300 - 400 $\mu$ m (makročástice) a méně než 50  $\mu$ m (mikročástice), které se nejčastěji podávají do *arteria carotis interna* [75]. Po aplikaci makročastic dochází k rozsáhlým mozkovým infarktům stejně jako po permanentní okluzi *arteria cerebri media*. Aplikace mikročastic potkanům do *arteria carotis interna* vyvolá během 7 dnů zvýšení laktátu, pokles mitochondriální oxidativní fosforylace a motorické potíže [79].

#### 5.4.1.3 Endothelinové a fototrombózní modely

Oba tyto modely jsou technicky méně náročné než např. distální okluze *arteria cerebra media*. U endothelinového modelu se intracerebrálně injikuje vysocevasokostriktivní látka endothelin-1, která vyvolá velmi rychlý pokles krevního toku v místě aplikace. Tento model fokální ischemie je velmi účinný u potkanů, ale u myší se k vyvolání ischemické léze musí kombinovat použití endothelinu-1 a okluze *arteria carotis communis* [80].

Fototrombózní model spočívá v použití fotosenzitivního barviva. Poprvé byla tato reakce popsána v roce 1985. Barvivo je intravenózně podáno a

následně intrakraniálně osvětleno. Světlo poté katalyzuje agregaci trombocytů v ozářené tkáni, čímž vytvořeno ischemické jádro [81].

## 5.4.2 Vybrané modely globální ischemie

Globální ischemie je charakterizována omezením krevního toku v celém mozku, které způsobuje poškození neuronů v CA1 oblasti hippocampu. Tyto modely jsou svými projevy podobné zástavě srdce a zadušení. Jsou proto používány ke studiu poškození mozku vyskytujícího se po resuscitaci srdce. Nejpoužívanějšími modely globální ischemie je okluze čtyř cév okluze dvou cév [1].

### 5.4.2.1 Okluze čtyř cév

Tento model je technicky velmi jednoduchý a spočívá v přerušení *arteriae vertebralis* kauterizací či jejich permanentní okluzí, která je doplněna dočasnou okluzí *arteriae carotis communis* [1].

### 5.4.2.2 Okluze dvou cév

Zde je bilaterálně podvázána *arteria carotis communis*, okluze je doplněna hypotenzí, která trvá stejně dlouho jako okluze. Hypotenze je navozena snížením tlaku kyslíku, řízeným krvácením, podáním vasodilatátorů nebo kombinací jednotlivých možností. Takovýto zásah vede k ischemickému poškození hippocampu a neokortexu [82].

## 6 Cíle práce

- stanovit vliv systémového podání  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok v mozku laboratorního potkana
- zavést a kriticky zhodnotit použitelnost modelu globální ischemie pro studium neuroprotektivních vlastností neuroaktivních steroidů
- stanovit neuroprotektivní vlastnosti  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  v modelu globální ischemie na kognitivní schopnosti potkanů v behaviorálních úlohách



## 7 Materiál a metody

### 7.1 Použitá zvířata

V experimentech bylo použito celkem 14 dospělých potkaních samců kmene Wistar (stáří 3 měsíce, váha 300 – 400g) a 62 dospělých potkaních samců kmene Long-Evans (stáří 3 – 4 měsíce, váha 300 – 400g) z chovů Fyziologického ústavu Akademie Věd ČR. Potkani byli chováni v plastových boxech 25 x 25 x 50cm v počtu 2 až 3 zvířata na box. Zvířata měla volný přístup k potravě a vodě. Světelný cyklus byl dvanáctihodinový, k zapnutí světla došlo vždy v 7:00.

Všechny experimenty probíhali v souladu se zákonem č. 246/1992 na ochranu zvířat proti týrání a vyhláškou o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat č. 207/2004.

### 7.2 Použité chemikálie a léčiva

Potkanům v jednotlivých experimentech jsme aplikovali roztok  $3\alpha5\beta$ P-Glu. Neuroaktivní steroid  $3\alpha5\beta$ P-Glu byl syntetizován v oddělení Neuroprotektiv Ústavu organické chemie a biochemie Akademie Věd ČR.  $3\alpha5\beta$ P-Glu byl rozpuštěn v roztoku (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrinu (CDX, Sigma Aldrich) s kyselinou citrónovou (3-hydroxy-penta-1, 3, 5-trikarboxylová kyselina, Sigma Aldrich), pH roztoku bylo upraveno pomocí hydroxidu sodného (NaOH, Sigma Aldrich) na hodnotu 7,4. Postupně jsme takto připravili jednotlivé dávky 0,1, 1 a 10 mg/kg  $3\alpha5\beta$ P-Glu. Potkanům jsme aplikovali jednotlivé koncentrace vždy v objemu 1ml/kg.

Jako anestetikum jsme při jednotlivých operacích používali inhalační anestetika Isoluran (Baxter) a ether (diethylether, Sigma Aldrich). K operační a pooperační péči jsme používali lékařskou vazelínu (Herbacos-Bofarma), antibiotikum Framykoin (Zentiva), analgetikum a nesteroidní antirevmatikum

Nurofen (Reckitt Benckiser Healthcare International Ltd) a fyziologický roztok (B Braun).

## 7.3 Použité přístroje a vybavení

K měření vlivu systémového podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok jsme použili digitální uspávací box (20 x 20 x 35cm), dvouramenný stereotaktický aparát (Kopf Instruments), infuzní set (Chirana T. Injecta), přístroj se sondou pro měření regionálního krevního průtoku PeriFlux System 5000 (Perimed) a přístroj se sondou pro měření saturace  $O_2$  Oxylab Tissue Oxygenation Monitor (Oxford Optronix).

K modelaci globální ischemie jsme použili hypoxický box (25 x 25 x 35cm) a plynovou bombu o složení 10%  $O_2$ , 90%  $N_2$  (Linde).

## 7.4 Metodické postupy

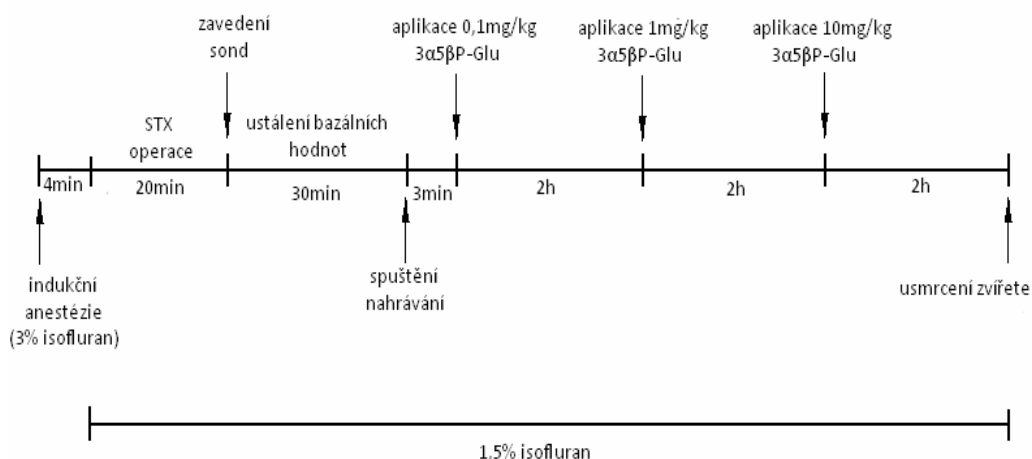
### 7.4.1 Popis operačních výkonů

#### 7.4.1.1 Experiment 1 – Měření saturace kyslíku a regionálního průtoku v mozku laboratorního potkana

Před zahájením operačního výkonu bylo zvíře umístěno do operačního boxu (20 x 20 x 35cm) a uspáno inhalační anestezií (Isofluran 3%). Poté byl do intraperitoneálního prostoru zaveden infuzní set. Následně byl potkan ukotven do stereotaktického aparátu, anestezie byla udržována na operační hloubce. Kvůli zabránění vysoušení byla na oči nanесena tenká vrstva vazelíny. Na obou hemisférách byla provedena trepanace lebky v souřadnicích 4mm posteriorně a 2,5mm laterálně od bregmy. Opatrně byla odstraněna lebeční kost a pod

operačním mikroskopem následně i *dura mater* v místě trepanace. Sondy byly stereotakticky zavedeny 2,8mm pod *duru mater* do CA1 oblasti dorzálního hippocampu, kde se nachází *arteria hippocampi transverse* [83]. Sonda na měření regionálního krevního průtoku byla umístěna v levém hippocampu a sonda na měření krevního průtoku v pravém. Isofluranová anestezie byla udržována na koncentraci 1,5%. Zvíře do konce experimentu leželo na zahřívací destičce s regulovatelnou teplotou, tělesná teplota byla monitorována pomocí rektálního čidla. Po 30 minutovém intervalu, nezbytnému k ustálení bazálních hodnot saturace kyslíku a krevního průtoku, bylo zahájeno nahrávání. Tři minuty od zahájení nahrávání byl přes infuzní set aplikován 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu v dávce 0,1mg/kg, následně bylo podáno 2ml fyziologického roztoku (kvůli propláchnutí setu a zároveň dodání tekutin). Po uplynutí 2h od aplikace první dávky byla stejným způsobem aplikována dávka 1mg/kg 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu a poté po dalších 2h byla podána dávka 10mg/kg 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu. Měření pak trvalo ještě 2h. Celkem byla změna hodnot regionálního krevního průtoku a saturace kyslíku v dorzálním hippocampu potkana snímána po dobu 6h. Schéma pokusu je pro větší přehlednost znázorněno na obr. 9. Na konci pokusu bylo zvíře humánním způsobem utraceno intraperitoneálním podáním 30% roztoku uretanu (4 ml/kg).

Použili jsme celkem 14 zvířat, přičemž čtyři zvířata byla z pokusu vyřazena. Pěti potkanům byla podávána v pravidelném odstupu 2h zvyšující se dávka 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu (0,1, 1 a 10mg/kg), dvěma zvířatům byl podáván pouze 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu v koncentraci 10mg/kg, 2 potkani dostali CDX a jeden fyziologický roztok.



Obr. 9: Časové uspořádání experimentu měření saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku v potkaním hippocampu

#### 7.4.1.2 Experiment 2 – Modelace globálního ischemického poškození mozku laboratorního potkana

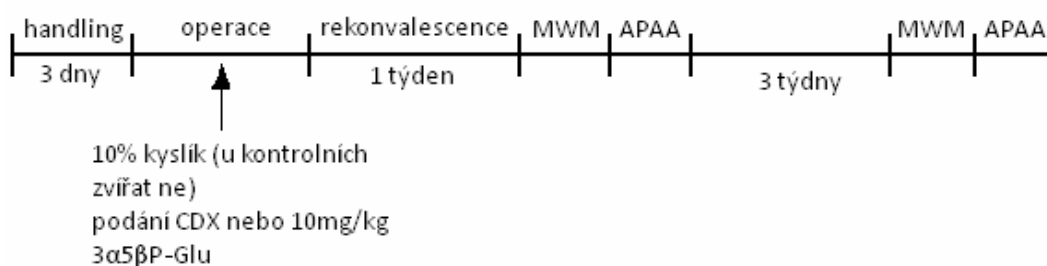
Potkani byli rozděleni do pěti skupin, kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným CDX (v grafech označeny sham+CDX), kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu (v grafech označeny sham+3α5βP-Glu), ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX (v grafech označeny isch+hypox+CDX), ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu (v grafech označeny isch+hypox+3α5βP-Glu) a intaktní zvířata (v grafech označeny intact).

Před zahájením operačního výkonu byl potkan uspán etherem. Kvůli zabránění vysoušení byla na oči nanесena tenká vrstva vazelíny. V místě operačního byla mu ostříhána srst. Měkké tkáně byly odstraněny tupou preparací. *Arteria carotis communis* byla oddělena od nervových vláken a neprůchodně uzavřena mechanickou kovovou svorkou. Na kontralaterální straně byl proveden tentýž zákrok. Během operace bylo zvíře pravidelně anestetizováno etherem.

Po provedení oboustranné okluze *arteriae carotis communis* bylo zvíře přemístěno na 30min do hypoxického boxu (25 x 25 x 35cm) syčeného inhalační anestezií (Isofluran 1,5%). Ischemickým-hypoxickým zvířatům byl obsah kyslíku v boxu snížen na 10% (plynová bomba: 10% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>). Po vyndání z boxu byly zvířeti ihned odstraněny mechanické svorky a intraperitoneálně aplikována podle příslušnosti do skupiny tj. CDX nebo CDX s 3α5βP-Glu 10mg/kg. Rána byla sešita ve dvou vrstvách a potřena antibiotikem Framykoin. Potkan byl umístěn do plastového boxu s ostatními operovanými potkany z téhož dne. Po dobu tří dnů byl zvířatům podáván roztok analgetika Nurofen ve vodě (1,5ml/0,5l).

#### 7.4.1.2.1 Chronologické schéma Experimentu 2

Zvířata byla přivýkána na kontakt s operátorem pomocí tzv. handlingu. Poté následovala operace s týdenní rekonvalescencí. Po zotavení se ze zákroku zvířata podstoupila behaviorální testy: Morrisovo vodní bludiště (MWM) a aktivní alotetické vyhýbání se místu (AAPA). Následovala třítýdenní pauza, po níž byly MWM a AAPA znovu opakovány. Časový harmonogram pokusu je znázorněn na obr. 10.



Obr. 10: Časové uspořádání experimentů při modelaci globálního ischemického poškození.

## 7.4.2 Behaviorální testy

### 7.4.2.1 Aktivní alotetické vyhýbání se místu

Aparatura pro AAPA má podobu kruhové kovové arény ( $\varnothing$  82cm) ohraničené plexisklovou stěnou (30cm). Zvíře se zde orientuje pomocí dvou prostorových rámců. Prvním z nich je vlastní oblast arény tzv. arena frame. Další orientační body jsou v místnosti, kde je aréna umístěna tzv. room frame. Motor umístěný na spodní straně zajišťuje rotaci arény (rychlost 1 otáčka/min). Rotací dochází k segregaci orientačních rámců. Zvíře se zde musí vyhýbat neviditelnému zakázanému sektoru ve tvaru kruhové výseče ( $60^\circ$ ), který je definován v rámci místnosti počítačovým systémem. Pokud potkan do tohoto sektoru vstoupí, dostane mírný elektrický šok (50Hz, 0,5s, 0,4 – 0,7mA) do tlapek. Jestliže zvíře v sektoru setrvá, šok je opakován každých 1200ms. Elektrické šoky jsou zvířeti udílány pomocí zakroucené kovové jehly implantované skrz volnou kůži za krkem. Po dobu experimentu zvíře má na hřbetě postroj, na němž je připevněna infračervená LED dioda. Další LED dioda je na obvodu arény pro monitorování rotace. Pozice zvířete je zaznamenávána každých 40ms a nahrávána do počítačového souboru. Experimenty probíhají za slabého osvětlení vyhovujícího zrakovému vnímání potkanů. Aparatura AAPA a způsob uchycení implantovaného potkana s jehlou do postroje je znázorněn na obr. 11.

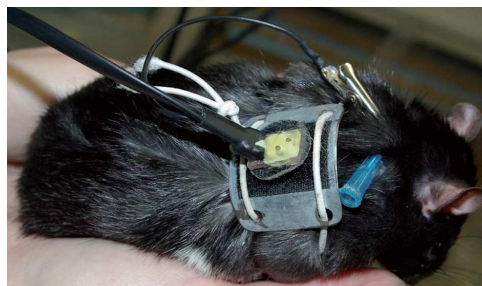
Experiment probíhal po dobu čtyř dnů. Poloha zakázaného sektoru byla stabilní po celou dobu. Sezení s jedním potkanem trvalo 20min.

AAPA je úloha náročná na prostorovou orientaci a velmi citlivá na hippocampální poškození. Experimentálně bylo prokázáno, že unilaterální inaktivace hippocampu způsobí neschopnost potkana zvládnout tento test.

a)



b)



Obr. 11: a) Aparatura pro úlohu AAPA, b) Uchycení implantovaného potkana s jehlou do postroje

#### 7.4.2.2 Morrisovo vodní bludiště

Aparatura MWM je tvořena kruhovým modře natřeným bazénem ( $\emptyset$  187cm, výška 40cm) naplněným vodou (cca 25°C). Potkan je vypouštěn z osmi možných pozic na obvodu bazénu. Jeho úkolem je najít průhledný ostrůvek ( $\emptyset$  10cm) skrytý 1cm pod vodní hladinou do 60s. Pokud se mu to nepodaří, je na ostrůvek naveden experimentátorem. Pozice potkana je snímána pomocí programu a soubor poté analyzován.

Experiment probíhal po dobu čtyř dnů. Poloha ostrůvku byla stabilní po celou dobu. Sezení se skládalo z osmi plaveb za den.

Ve srovnání s AAPA je úloha MWM méně citlivá k hippocampálnímu poškození. Potkani ji nejsou schopni řešit až při bilaterální lézi hippocampu. V AAPA dochází k segregaci rámců rotací, proto je více náročná na prostorovou orientaci. Oproti tomu MWM je test čistě zaměřený na paměťové schopnosti zvířete, které ve vodě nemůže zanechávat pachové značky, zatímco v AAPA ano.

### 7.4.3 Statistické vyhodnocení

Všechna data získaná v experimentu 1 (vliv systémového podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok) byla off-line vyhodnocena v programu Matlab (Mathworks). Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu SigmaStat (Systat Inc) s použitím neparametrického kritéria Mann-Whitney.

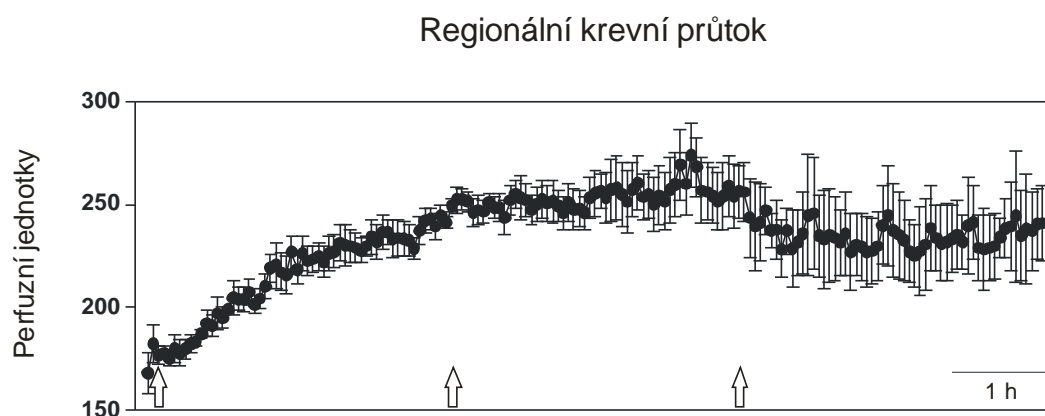
V experimentu 2 (vliv systémového podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu na globální ischemické poškození mozku) jsme hodnotili přežívání potkanů Kaplan-Meyerovou analýzou a data z behaviorálních testů MWM a AAPA. Pozice potkana v MWM a AAPA byla zaznamenávána do souboru programem iTrack (Biosignal group). Tento soubor byl poté off-line analyzován programem TrackAnalysis (Biosignal group). V případě úlohy MWM jsme vyhodnocovali uplavanou dráhu a latenci v jednotlivých dnech s použitím funkce dvojité ANOVA v programu Statistica 8.0 (StatSoft). U úlohy AAPA jsme statisticky hodnotili ušlou dráhu, počet vstupů do zakázaného sektoru, čas prvního vstupu do zakázaného sektoru a maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru vždy poslední den experimentu. Pro tento účel jsme použili funkci jednoduchá ANOVA (Statistica 8.0, StatSoft).



## 8 Výsledky

### 8.1 Experiment 1

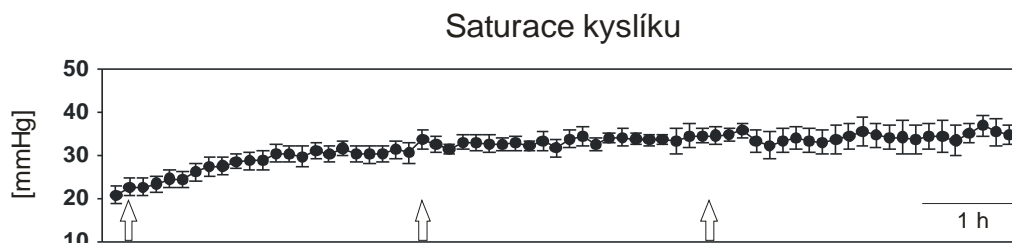
Největší nárůst regionálního krevního průtoku byl zaznamenán po podání první dávky  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$   $0,1\text{mg/kg}$ , kdy došlo k signifikantnímu zvýšení v průměru o 45% oproti bazálním hodnotám ( $p < 0,001$ ). Koncentrace  $1\text{mg/kg}$   $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  udržovala plató fázi, při koncentraci  $10\text{mg/kg}$  byl zaznamenán mírný pokles. Na grafu 1a je znázorněn časový průběh změny regionálního krevního průtoku po aplikaci vzrůstajících koncentrací  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Bílé šipky značí okamžik podání různých koncentrací  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . První šipka zleva označuje podání koncentrace  $0,1\text{mg/kg}$ , druhá pak  $1\text{mg/kg}$  a poslední šipka koncentraci  $10\text{mg/kg}$   $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ .



Graf 1a: Vliv intraperitoneálního podání zvyšujících se koncentrací  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  (šipky zleva 0,1, 1 a  $10\text{mg/kg}$ ) na regionální krevní průtok v dorzálním hippokampu dospělých potkanů kmene Wistar ( $n=5$ ). Podání  $0,1\text{mg/kg}$   $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  vedlo k signifikantnímu vzrůstu regionálního krevního průtoku ( $p < 0,001$ ) v průměru o 45%. Data prezentována jako průměry hodnot měření ( $n=5$ )  $\pm$  S. E. M.

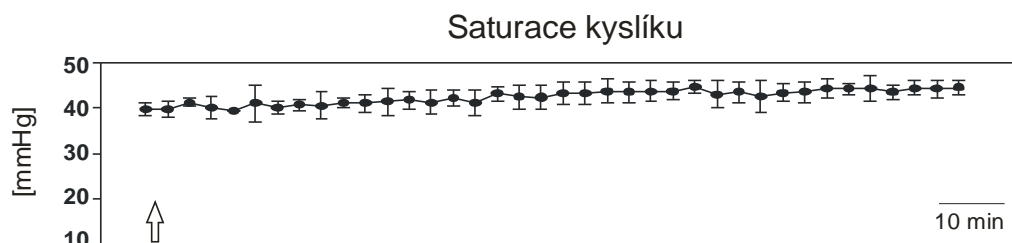
Graf 1b popisuje časovou dynamiku změny hodnot saturace kyslíku v dorzálním hippokampu potkana po podání zvyšujících se koncentrací  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Po aplikaci dávky  $0,1\text{mg/kg}$  se saturace kyslíku signifikantně zvýšila

v průměru o 55% oproti bazálním hodnotám ( $p < 0,001$ ). Následující koncentrace tuto hladinu poté udržovaly.



Graf Ib: Účinek intraperitoneálního podání zvyšujících se koncentrací 3α5βP-Glu (šipky zleva 0,1, 1 a 10mg/kg) na saturaci kyslíku v dorzálním hippokampu dospělých potkanů kmene Wistar ( $n=5$ ). Aplikace 0,1mg/kg 3α5βP-Glu vedla k signifikantnímu zvýšení saturace kyslíku ( $p < 0,001$ ) průměrně o 55%.

Graf Ic znázorňuje změnu hodnot saturace kyslíku po aplikaci dávky 10mg/kg. Zde byl zaznamenán v průměru 13% signifikantní nárůst oproti bazálním hodnotám ( $p < 0,1$ ).



Graf Ic: Efekt intraperitoneální aplikace 10mg/kg 3α5βP-Glu na saturaci kyslíku v dorzálním hippokampu potkanů kmene Wistar ( $n=2$ ). Podání 10mg/kg 3α5βP-Glu vedlo k signifikantnímu nárůstu saturace kyslíku v průměru o 13% ( $p < 0,1$ ).

## 8.2 Experiment 2

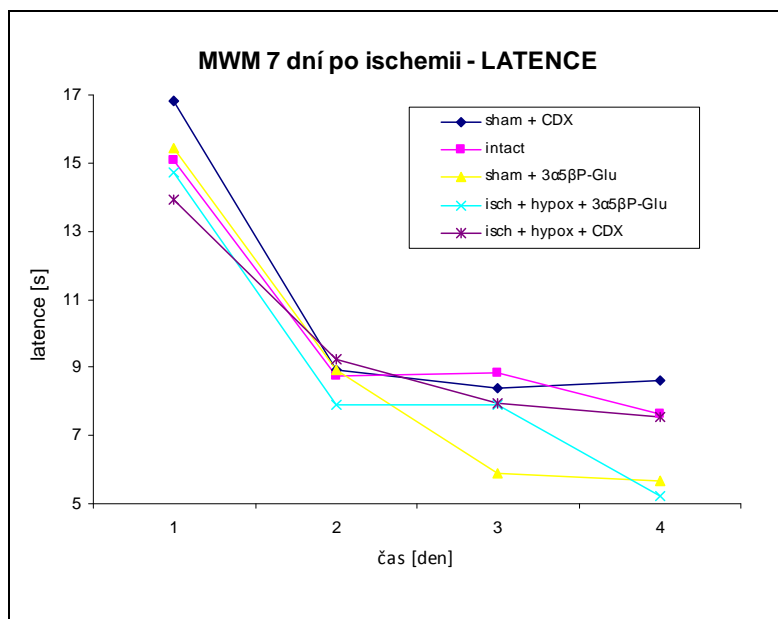
### 8.2.1 Přežívání

Kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným CDX vykazovala 13% mortalitu. Kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu měla mortalitu 0%. Ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX měla 74% mortalitu. Ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu měla 60% mortalitu. Intaktní zvířata vykazovala 0% mortalitu.

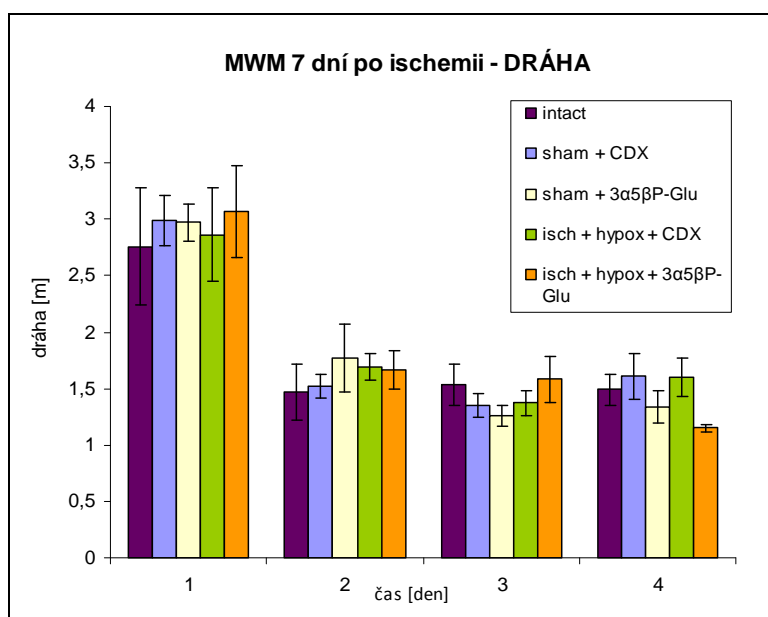
### 8.2.2 MWM 7 dní po ischemii

Pro zhodnocení prostorové orientace a rychlosti učení byly použity parametry uplavené dráhy (m) a latence (s), tj. doba, za kterou potkan našel ostrůvek.

Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami ani v jednom ze sledovaných parametrů. Statisticky jsme hodnotili latenci i dráhu u jednotlivých skupin v každém dni. Latence faktor skupina [4, 27]=0,498;  $p=0,737$ , faktor dny [3, 81]=77,394;  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,936;  $p=0,516$ . Dráha faktor skupina [4, 27]=0,17;  $p=0,952$ , faktor dny [3, 81]=46,548;  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,833;  $p=0,616$ . Na konci experimentu ostrůvku nejdříve dosáhla ischemická hypoxická zvířata s aplikovaným 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu. Průběhy latence všech skupin v závislosti na dni jsou zobrazeny na grafu IIa. Z hlediska uplavené dráhy byla zvířata ve všech skupinách vyrovnána. Čtvrtý den experimentu našla ostrůvek s nejkratší dráhou ischemická hypoxická zvířata s aplikovaným 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu. Uplavaná dráha v závislosti na dni je znázorněna na grafu IIb.



Graf IIa: Srovnání latence u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Latence faktor skupina [4, 27]=0,498;  $p=0,737$ , faktor dny [3, 81]=77,394;  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,936;  $p=0,516$ . Poslední den experimentu ostrůvku v nejkratším čase dosáhla ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu.



Graf IIb: Srovnání uplavané dráhy u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Dráha faktor skupina [4, 27]=0,17;  $p=0,952$ , faktor dny [3, 81]=46,548;  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,833;  $p=0,616$ . Poslední den experimentu doplávala k ostrůvku v nejkratším čase ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu.

### 8.2.3 AAPA 14 dní po ischemii

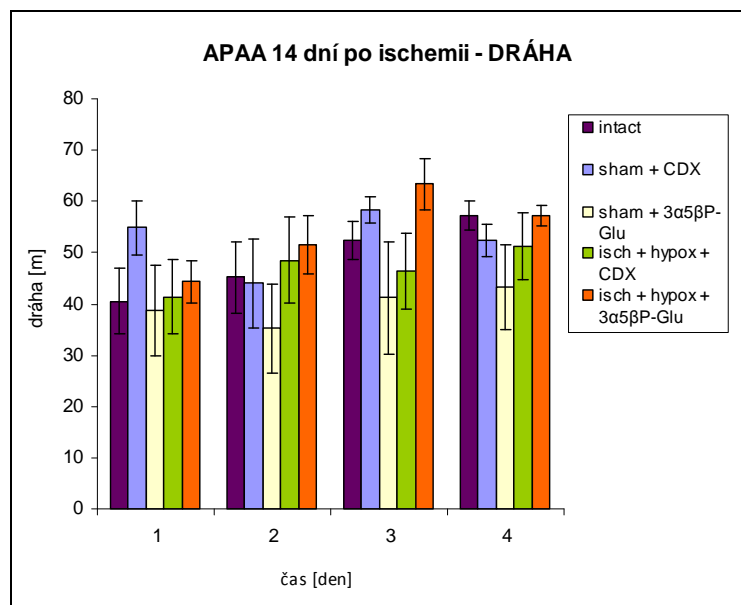
Zakázaný sektor se nalézal v oblasti West. Z hlediska hodnocení úspěšnosti zvířete v úloze AAPA jsou nejdůležitějšími parametry ušlá dráha, počet vstupů do zakázaného sektoru, čas prvního vstupu do zakázaného sektoru a maximální čas vyhýbání se zakázanému místu.

Dráha: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly v lokomoci mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili ušlou dráhu zvířat poslední den experimentu. Dráha faktor skupina [4, 27]=1,339;  $p=0,281$ . Ušlá dráha zvířat v jednotlivých dnech je znázorněna na grafu IIc.

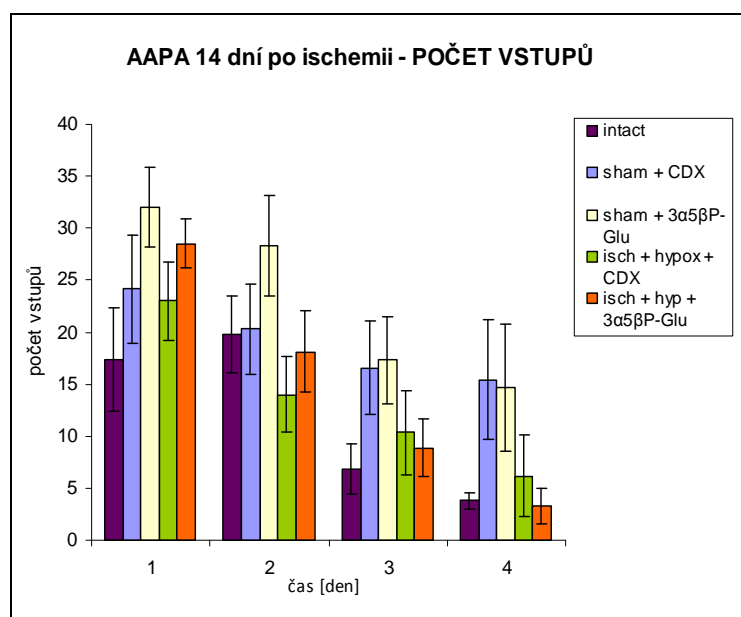
Počet vstupů do zakázaného sektoru: Statistika nenašla žádné signifikantní rozdíly. Statisticky jsme hodnotili počet vstupů do zakázaného sektoru poslední den experimentu. Počet vstupů faktor skupina [4, 27]=1,992;  $p=0,124$ . Čtvrtý den měli nejmenší počet vstupů ischemická hypoxická zvířata s aplikovaným  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Počet vstupů do zakázaného sektoru v jednotlivých dnech je znázorněn na grafu IId.

Čas prvního vstupu do zakázaného sektoru: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Statisticky jsme hodnotili čas prvního vstupu do zakázané oblasti poslední den experimentu. Čas prvního vstupu faktor skupina [4, 27]=0,301;  $p=0,874$ . Nejdéle se prvnímu vstupu do zakázaného sektoru poslední den experimentu dokázala vyhýbat ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX a ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Čas prvního vstupu do zakázané oblasti je znázorněn na grafu IIe.

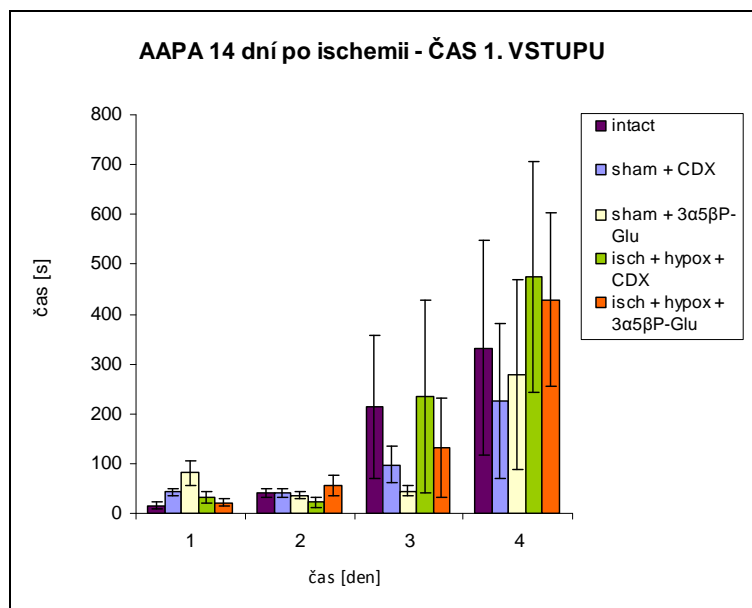
Maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Statisticky jsme hodnotili maximální čas vyhýbání se zakázané oblasti poslední den experimentu. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu faktor skupina [4, 27]=0,769;  $p=0,555$ . Poslední den experimentu se nejdéle dokázala zakázanému sektoru vyhýbat ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  a intaktní zvířata. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu je znázorněn na grafu II f.



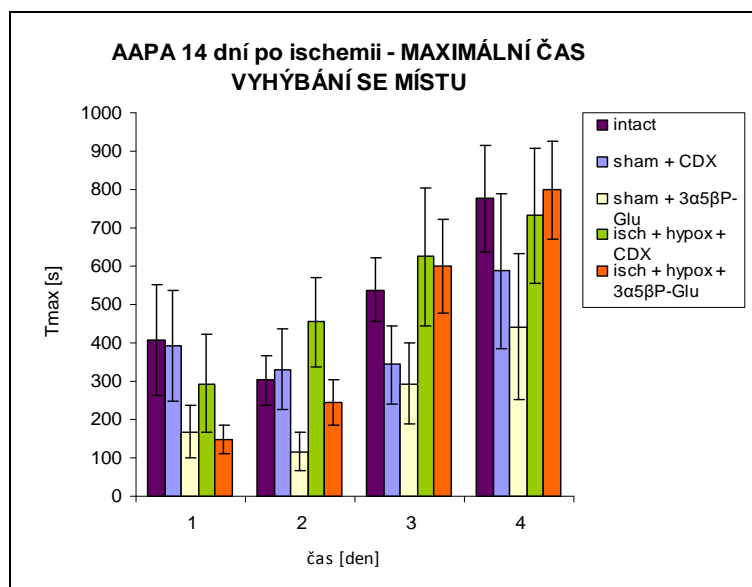
Graf IIc: Srovnání ušlé dráhy u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Dráha faktor skupina [4, 27]=1,339;  $p=0,281$ .



Graf IIId: Srovnání počtu vstupů do zakázaného sektoru u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Počet vstupů faktor skupina [4, 27]=1,992;  $p=0,124$ . Poslední den měla nejmenší počet vstupů ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu.



Graf IIe: Srovnání času prvního vstupu do zakázaného sektoru u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Čas prvního vstupu faktor skupina [4, 27]=0,301;  $p=0,874$ . Na konci experimentu se prvnímu vstupu do zakázané oblasti nejdéle vyvarovala ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX a ischemická-hypoxická zvířata aplikovaným 3α5βP-Glu.

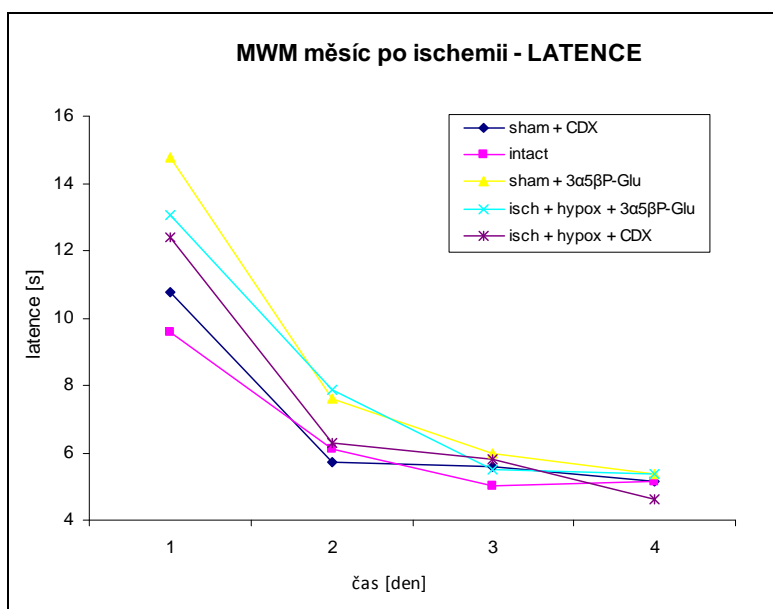


Graf II f: Srovnání maximální doby vyhýbání se zakázané oblasti u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu faktor skupina [4, 27]=0,769;  $p=0,555$ . Poslední den se po nejdelší čas dokázala vyhýbat zakázanému sektoru ischemická-hypoxická zvířata aplikovaným 3α5βP-Glu a intaktní zvířata.

## 8.2.4 MWM měsíc po ischemii

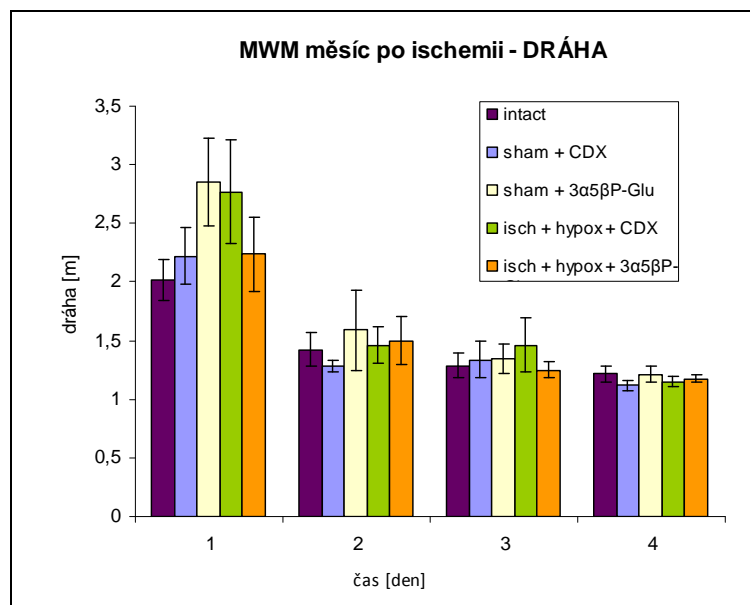
Tři týdny od skončení prvního MWM jsme úlohu MWM zopakovali. Změnili jsme polohu skrytého ostrůvku z North-west na South, abychom zjistili, s jakou rychlostí se zvířata dokážou naučit novou pozici.

Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili latenci i dráhu u jednotlivých skupin v každém dni. Latence faktor skupina [4, 27]=1,941;  $p=0,132$ , faktor dny [3, 81];  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,942;  $p=0,51$ . Dráha faktor skupina [4, 27]=0,979;  $p=0,435$ , faktor dny [3, 81];  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,736;  $p=0,685$ . Téměř po celou dobu experimentu byla zvířata mezi jednotlivými skupinami vyrovnána v parametrech latence i uplavané dráhy s jakou našli ostrůvek. Průběhy latence všech skupin v závislosti na dni jsou zobrazeny na grafu IIg. Uplavaná dráha v závislosti na dni je znázorněna na grafu IIh.



Graf IIg: Srovnání latence u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Latence faktor skupina [4, 27]=1,941;  $p=0,132$ , faktor dny [3, 81];  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,942;  $p=0,51$ . První den experimentu se mezi jednotlivými skupinami vyskytovali mírné rozdíly, které se v pozdějších dnech smazaly.





Graf IIh: Srovnání uplavané dráhy u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Dráha faktor skupina [4, 27]=0,979;  $p=0,435$ , faktor dny [3, 81];  $p < 0,001$ , interakce mezi faktory [12, 81]=0,736;  $p=0,685$ . První den na ostrůvek s nejkratší dráhou (nejlépe se učila) intaktní zvířata, kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným CDX a ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným 3α5βP-Glu.

## 8.2.5 AAPA měsíc a týden po ischemii

Opakování úlohy AAPA následovalo 3 dni po opakování úlohy MWM. Zakázaný sektor definovaný rámcem místnosti byl z oblasti West přemístěn do oblasti East.

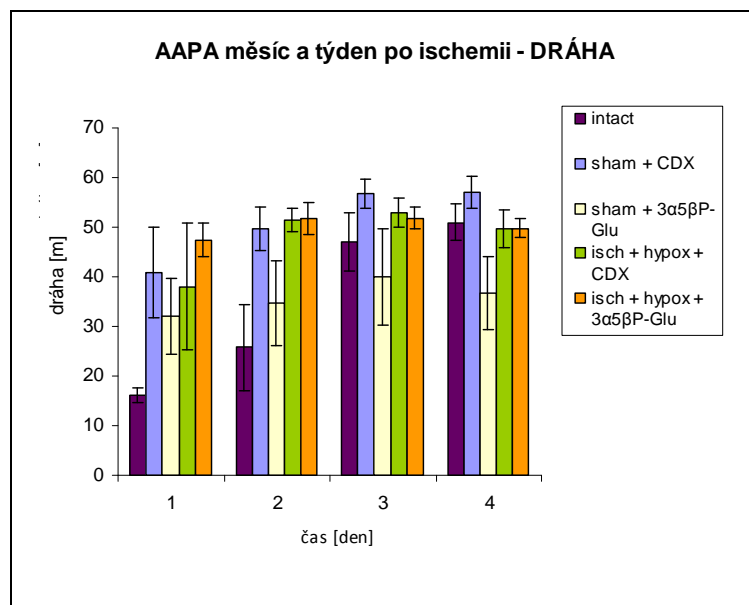
Dráha: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly v lokomoci mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili ušlou dráhu zvířat poslední den experimentu. Dráha faktor skupina [4, 20]=1,251;  $p=0,108$ . Ušlá dráha zvířat v jednotlivých dnech je znázorněna na grafu IIch.

Počet vstupů do zakázaného sektoru: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly v lokomoci mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili ušlou dráhu zvířat poslední den experimentu. Počet vstupů do zakázaného sektoru faktor skupina [4, 20]=2,181;  $p=0,108$ . Poslední den experimentu měla nejmenší počet vstupů do zakázané oblasti ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX a kontrolně operovaná zvířata

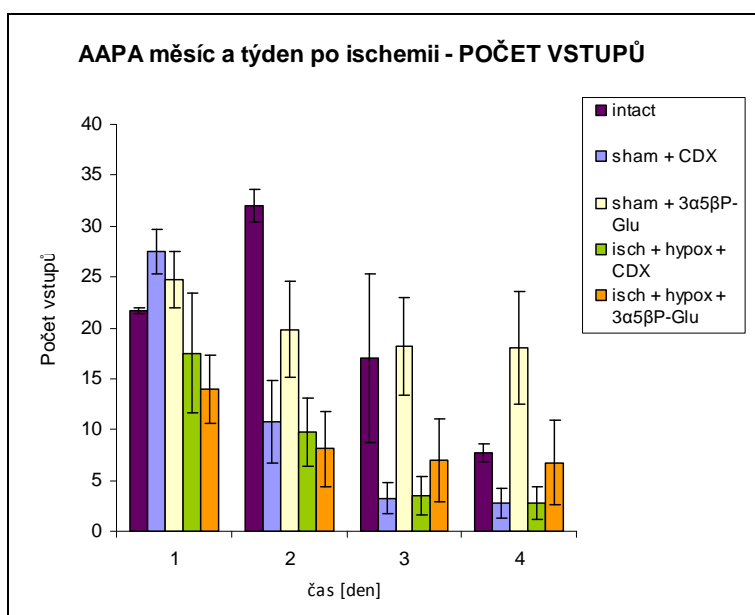
s aplikovaným CDX. Nejhorším výsledků dosahovala kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Počet vstupů do zakázaného sektoru v jednotlivých dnech je znázorněn na grafu Ili.

Čas prvního vstupu do zakázaného sektoru: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly v lokomoci mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili ušlou dráhu zvířat poslední den experimentu. Čas prvního vstupu faktor skupina  $[4, 20]=0,677$ ;  $p=0,616$ . Poslední den experimentu se nejdéle prvnímu vstupu do zakázaného sektoru dokázala vyhýbat ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX. Čas prvního vstupu do zakázané oblasti je znázorněn na grafu IIj.

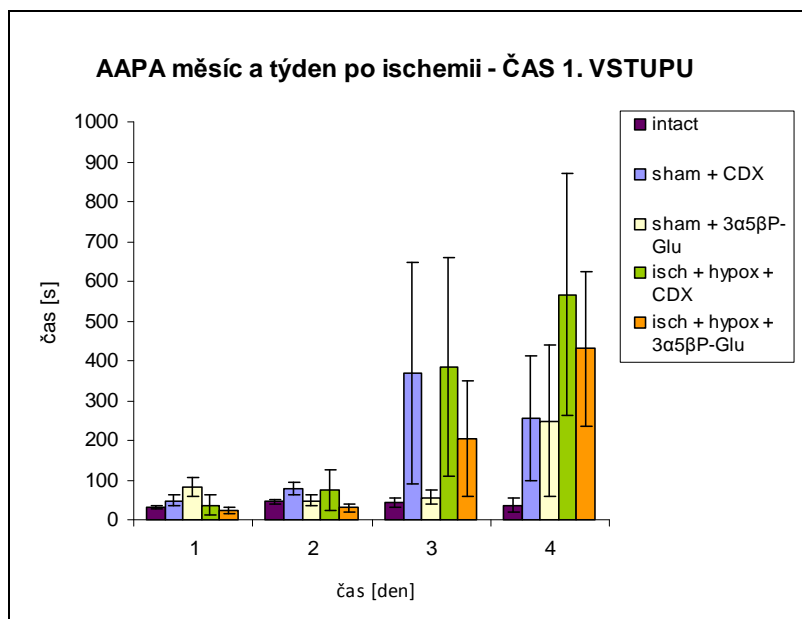
Maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru: Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly v lokomoci mezi jednotlivými skupinami. Statisticky jsme hodnotili ušlou dráhu zvířat poslední den experimentu. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu faktor skupina  $[4, 20]=2,213$ ;  $p=0,104$ . Poslední den experimentu se nejdéle zakázanému sektoru dokázala vyhýbat ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu je znázorněn na grafu IIk.



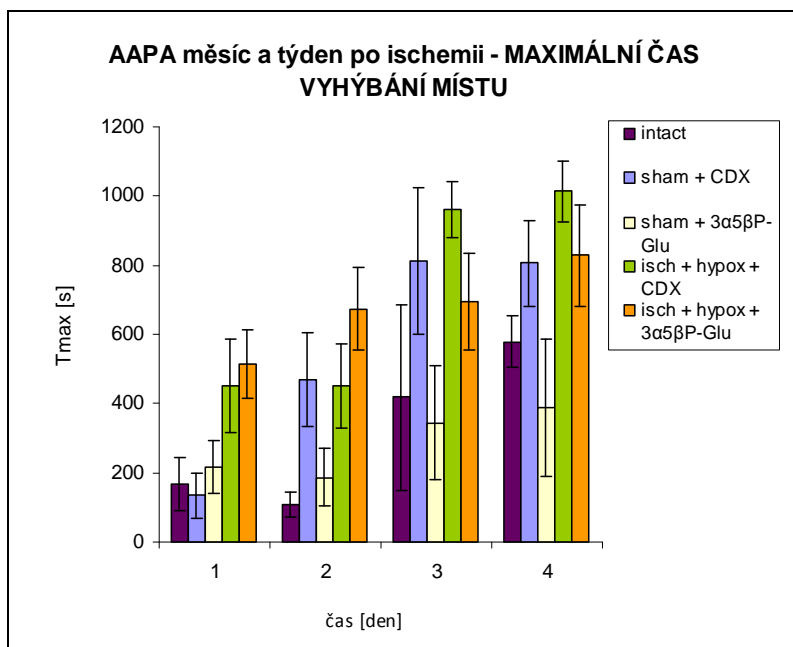
Graf IIh: Srovnání ušlé dráhy u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Dráha faktor skupina [4, 20]=1,251;  $p=0,108$ .



Graf IIi: Srovnání počtu vstupů do zakázaného sektoru u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Počet vstupů do zakázaného sektoru faktor skupina [4, 20]=2,181;  $p=0,108$ . Poslední den měla nejmenší počet vstupů kontrolně operovaná zvířata s aplikovaným CDX a ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX.



Graf IIj: Srovnání času prvního vstupu do zakázaného sektoru u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Čas prvního vstupu faktor skupina [4, 20]=0,677;  $p=0,616$ . Na konci experimentu se po nejdelší dobu dokázala prvnímu vstupu vyhnout ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX.



Graf IIk: Srovnání maximální doby vyhýbání se zakázané oblasti u jednotlivých skupin v závislosti na dni. Statistika neprokázala žádné signifikantní rozdíly. Maximální čas vyhýbání se zakázanému místu faktor skupina [4, 20]=2,213;  $p=0,104$ . Poslední den se nejdéle zakázanému místu vyhýbala ischemická-hypoxická zvířata s aplikovaným CDX.

## 9 Diskuze

Je prokázáno, že 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu je use-dependentní inhibitor aktivních NMDA receptorů stejně jako jeho přírodně vyskytující se analog 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-S [5]. Předpokládali jsme, že jestliže 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu specificky inhibuje NMDA receptory, podání látky by mohlo mít neuroprotektivní účinek v *in vivo* modelech.

Prvním cílem mé diplomové práce bylo stanovit vliv 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu systémového podání zvyšujících se dávek 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu (0,1, 1 a 10mg/kg) na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok v mozku laboratorního potkana. Měření probíhalo v dorzálních částech CA1 oblastí obou hippokampů, kde se nalézá *arteria hippocampi transverse* [83].

Intraperitoneální podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu 0,1 mg/kg vedlo k signifikantnímu zvýšení saturace kyslíku (v průměru o 45%) i regionálního krevního průtoku (v průměru o 55%). Ostatní použité koncentrace 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu (1 a 10mg/kg) hladinu těchto hodnot poté udržovaly. Pokud jsme aplikovali pouze nejvyšší použitou koncentraci tj. 10mg/kg 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu, zaznamenali jsme 13% signifikantní nárůst saturace kyslíku oproti počátečním hodnotám.

Výše zmíněné kumulační dávky 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu jsme podávaly pro zjištění případných neočekávaných efektů např. smrti či pokles tělesné teploty, které by mohly při použití vysokých koncentrací nastat. Žádné takovéto efekty jsme nezaznamenaly.

Experimentálně byl zkoumán vliv intraperitoneálního podání ketaminu 100mg/kg na regionální krevní průtok a saturaci kyslíku v kortexu dospělého potkana za fyziologických podmínek. Žádné změny v obou parametrech po podání ketaminu nebyly pozorovány [84]. Naproti tomu u potkanů, kteří prodělali globální ischemii mozku, aplikace S (+) ketaminu v dávce 60 a 90mg/kg 15min po ischemii vracela hodnoty saturace kyslíku k preischemické hladině [85]. Dále byl studován vliv podání MK-801, který je též nekompetitivním NMDA antagonistou, na regionální krevní průtok a poměr dodávky kyslíku vůči spotřebě při 15min trvající okluzi *arteria cerebra media*. Látka MK-801, v dávce 5mg/kg prokázala schopnost zlepšit poměr dodávky kyslíku vůči spotřebě kyslíku v ischemickém regionu mozku. Hodnoty

regionálního krevního průtok se mezi potkany, kterým byl aplikován MK-801 a kontrolami nijak nelišily [86].

Z těchto údajů vyplývá, že námi studovaný  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  signifikantně zvyšuje hodnoty saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku bez nečekaných vedlejších účinků. Ve srovnání s ketaminem  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  tyto hodnoty ovlivňuje již za fyziologických podmínek. Toto naznačuje neuroprotektivní potenciál  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ , jelikož mnoho neuroprotektivních látek zejména nootropika způsobují pozitivní změny saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku [2].

Dalším cílem mé práce bylo zavést a kriticky zhodnotit použitelnost modelu globální ischemie pro studium neuroprotektivních vlastností neuroaktivních steroidů. Animální model globálního ischemického poškození mozku, který jsme použili, spočívá v bilaterálním uzavření *arteriae carotis communis* a následném umístění zvířete do hypoxického boxu (10%  $\text{O}_2$ ). Ihned po vyndání z hypoxického boxu následovala aplikace  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  10mg/kg. Použitím tohoto modelu jsme prokázali, že intraperitoneální podání  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  10mg/kg bezprostředně po zákroku snižuje mortalitu u zvířat. Z těchto údajů vyplývá, že aplikace  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  pozitivně ovlivňuje schopnost potkanů zotavit se po takto náročném stavu ohrožující život.

Dále jsme pomocí tohoto modelu a následných behaviorálních testů určovali neuroprotektivní vliv  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  na kognitivní funkce po prodělané ischemii. Behaviorální úlohy MWM a AAPA následující po zákroku však žádný statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami neprokázaly ani v jednom z hodnocených parametrů. Byly stanoveny také případné pohybové defekty vyskytující se po zákroku, zvířata proto podstoupila testy zaměřené na motorickou koordinaci. Tyto úlohy však rovněž neprokázaly žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami.

Experimentálně bylo prokázáno, že již sama isofluranová anestezie (2%) má negativní vliv na hippokampálně závislé behaviorální úlohy v u myši při jeho podání 24h před behaviorální úlohou [87]. V našem případě se tento efekt

neprojevil, jelikož zvířata, která přežila zákrok, neměla poškození ovlivňující kognitivní funkce.

Z výsledků vyplývá, že stav globální ischemie indukoval vysokou mortalitu, která byla u některých zvířat způsobena závažnými epileptickými stavy. Nicméně přeživší zvířata nevykazovala zhoršení paměťových či kognitivních funkcí. Je třeba zmínit, že zvířata s aplikovaným 3 $\alpha$ 5 $\beta$ P-Glu neměla hyperlokomoční projevy v AAPA, které by mohly být známkou nežádoucích psychotomimetických projevů.

Modely různě trvající bilaterální okluze v kombinaci s různě velkou hypoxií byly v minulosti používány např. při zjištění vlivu memantinu na velikost infarktového ložiska u 7 až 10 denních potkaních mlád'at. Zde byla využita 25min trvající bilaterální okluze v kombinaci s 8% hypoxií. Memantin podávaný v dávce 20mg/kg 30min před zákrokem a poté v intervalu 12h v koncentraci 1mg/kg vedl snížení velikosti infarktového ložiska, které bylo měřeno pomocí MRI [49]. U dospělých zvířat byly pomocí 10% hypoxie v kombinaci s okluzí *arteria carotis communis* sledovány změny koncentrací v extracelulárním prostoru u laktátu, Glu, glukózy a pyruvátu při probíhající ischemii/hypoxii. Koncentrace metabolitů byly měřeny pomocí mikrodialýzy [88]. Dále byly imunohistochemicky stanovovány změny v morfologii gliových buněk hippokampu u 15min trvající bilaterální okluze *arteriae carotis communis* kombinované s 6% hypoxií [89] či změna difuzních parametrů extracelulárního prostoru [90].

Model bilaterální okluze *arteriae carotis communis* v kombinaci s různě velkou hypoxií se zdá být vhodný pro monitorování biochemických změn či difuzních parametrů v ischemické tkáni a stanovení velikosti infarktového ložiska. Z hlediska měření vlivu ischemicko-reperfuzního poškození mozku na paměťové funkce, prostorovou kognici a následný vliv neuroprotektivních látek má však značné limity. Proto se v budoucnosti zaměříme na zavedení vhodnějšího animálního modelu ischemického poškození, jímž bude možno přesněji kvantifikovat neuroprotektivní vliv neuroaktivních steroidů na behaviorální projevy a následné učení potkanů po zákroku. Z tohoto hlediska se

nám lépe jeví model fokální ischemie *arteria cerebra media*. Na druhou stranu tento model lokální ischemie není vhodný k měření parametru přežívání.

Neuroprotektivní vliv  $3\alpha5\beta$ P-Glu byl v naší laboratoři prokázán, jak již bylo zmíněno, na zvířatech s bilaterální NMDA lézí hippocampu. Aplikace  $3\alpha5\beta$ P-Glu vyústila v redukci morfologických znaků poškození pyramidálních buněk *gyrus dentatus*, CA1 – CA3 oblastí a subikula. Dále podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu v dávce 0,1 a 1mg/kg 30min po lézi či 10mg/kg po třech hodinách od léze vedlo k zlepšení zvířat v behaviorální úloze AAPA. Pokud byl  $3\alpha5\beta$ P-Glu podán 24h po zákroku, žádný pozitivní efekt na prostorovou kognici v úloze AAPA pozorován nebyl [9]. Toto naznačuje přítomnost tzv. terapeutického okna pro účinné podání  $3\alpha5\beta$ P-Glu. Z tohoto důvodu jsme v našem experimentu aplikovaly  $3\alpha5\beta$ P-Glu ihned po skončení ischemického inzultu.

Neuroprotektivní vlastnosti pozitivně ovlivňující stav po ischemickém poškození mozku byly stanoveny také u některých nekompetitivních NMDA antagonistů např. u MK-801. Tato látka v ischemických modelech prokázala značný neuroprotektivní potenciál [45], nicméně její použití je nepřipustné díky závažným psychotomimetickým projevům po její aplikaci. Stejně nežádoucí účinky se vyskytují též u ostatních nekompetitivních NMDA antagonistů [46].

Z hlediska redukce ischemického poškození bylo testováno několik neurosteroidů. Například DHEA v koncentraci 20mg/kg významně redukovala buněčnou smrt v CA1 oblasti a zlepšovala prostorovou orientaci potkanů v modelu okluze čtyř cév [91]. DHEAS je přirozeně vyskytující se sulfatovaný ester DHEA, i on v koncentraci 20mg/kg při bilaterální okluzi *arteria carotis communis* prokázal značný neuroprotektivní potenciál [92].

Molekulou neuroaktivního steroidu velmi testovanou v různých modelech ischemie je  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon hemisukcinát (20-oxo- $5\beta$ -pregnan- $3\alpha$ -yl hemisukcinát,  $3\alpha5\beta$ P-HS), který je stejně jako  $3\alpha5\beta$ P-Glu syntetický analog  $3\alpha5\beta$ P-S. Při permanentní okluzi *arteria cerebra media* byl  $3\alpha5\beta$ P-HS podán v dávce 6,9mg/kg 30min po začátku okluze, 24h od začátku okluze proběhlo měření velikosti infarktových ložisek. U zvířat s aplikovaným  $3\alpha5\beta$ P-HS byla tato ložiska signifikantně menší [93]. Dále  $3\alpha5\beta$ P-HS prokázal pozitivní efekt na



léčbu zvířat v modelu ischemie páteřní míchy. Zde byl  $3\alpha5\beta\text{P-HS}$  aplikován v dávce 25mg/kg 5 a 30min po startu okluze [94].  $3\alpha5\beta\text{P-HS}$  byl také testován na králících v modelu mnohonásobné ischemie, kdy byly do mozku aplikovány krevní sraženiny. Zde byla rovněž dávka 25mg/neuroprotektivní [95].

Náš výzkum ukazuje, že má značný neuroprotektivní potenciál  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$ . Podání  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  signifikantně výrazně zvyšuje saturaci kyslíku a regionální krevní průtok v mozku, snižuje mortalitu a nemá žádné nečekané či nežádoucí vedlejší účinky. Námi používaný model globální ischemie se ukázal být vhodný pro stanovení přezívání zvířat po ischemickém stavu, ale nežádoucí pro hodnocení behaviorálních parametrů. V budoucnosti proto zavedeme model fokální ischemie, který se zdá být z tohoto hlediska vhodnější. Dále bude probíhat měření vlivu systémového podání jednotlivých dávek  $3\alpha5\beta\text{P-Glu}$  na saturaci kyslíku a regionální krevní průtok. Postupně takto chceme porovnat efekt různých molekul neuroaktivních steroidů na oba sledované parametry.

## 10 Závěr

Výsledky této diplomové práce ukazují, že systémové podání zvyšujících se koncentrací use-dependentního antagonisty NMDA receptoru  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu vede k signifikantnímu zvýšení saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku, což potvrzuje neuroprotektivní efekt  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu.

V modelu globální ischemie kombinované s 10% hypoxií jsme prokázali, že aplikace  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu má pozitivní vliv na přežití zvířete po zákroku. V pozdějších behaviorálních úlohách Morrisova vodního bludiště a aktivního alotetického vyhýbání se místu nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami zvířat. Podání  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu nemělo žádné vedlejší nežádoucí účinky, které se vyskytují u nekompetitivních NMDA antagonistů.

Z této studie vyplývá, že  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát výrazně zvyšuje saturaci kyslíku a regionální krevní průtok v hippocampu potkana a též pozitivně ovlivňuje schopnost přežití zvířete po ischemicko-hypoxickém stavu bez vlivu na chování zvířete. Díky tomuto by  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát mohl v budoucnosti postoupit do klinických zkoušek jako lék na následky ischemicko-reperfuzní poškození mozku při cévních mozkových příhodách.

## 11 Seznam literatury

- [1] Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S., Sobey C.G., Taylor S.M., Arumugam T.V. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular model of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, 6
- [2] Jain K.K (2011) *The Handbook of Neuroprotection*. Humana Press, ISBN 978-1-61779-048-5
- [3] Paoletti P., Neyton J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7: 39-47
- [4] Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjövall J., Baulieu E.E. (1981) Characterization and measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 78: 4704-4707
- [5] Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L. (2005) 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfate is use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of Neuroscience*, 25: 8439-8450
- [6] Reed M.J., Purohit A., Woo L.W., Newman S.P., Potter B.V. (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocrine reviews*, 26: 171-202
- [7] Knapstein P., David A., Wu C.H., Archer D.F., Flickinger G.L., Tochstone J.C. (1968) Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids*, 11: 885-896
- [8] Wang M.D., Wahlstrom G., Backstrom T. (1997) The regional brain distribution of the neurosteroids pregnenolon and pregnenolon sulfate following intravenous infusion. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 62: 299-306
- [9] Rambousek L., Bubenikova-Valesova V., Kacer P., Syslova K., Kenney J., Holubova K., Najmanova V., Zach P., Svoboda J., Stuchlik A., Chodounska H., Kapras V., Adamusova E., Vyklicky L., Vales K. (2011) Cellular and behavioural effects of new steroidal inhibitor of the N-methyl-D-aspartate receptor 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology*, 61: 61-68
- [10] Ginsberg M.D. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 55: 363-389
- [11] Ovbiagele B., Kidwell C.S., Starkman S., Saver J.L. (2003) Potential role of neuroprotective agents in the treatment of patients with acute ischemic stroke. *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 5: 441-449

- [12] Ovbiagele B., Kidwell C.S., Starkman S., Saver J.L. (2003) Neuroprotective agents for treatment of acute ischemic stroke. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 3: 9-20
- [13] STAIR Investigators (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 30: 2752-2758
- [14] Štípek S. a kol (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing s.r.o., 1. vydání, ISBN 80-7169-704-4
- [15] Osakada F., Hashino A., Kume T., Katsuki H., Kaneko S., Akaike A. (2003) Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *European Journal of Pharmacology*, 465: 15-22
- [16] Sano M., Ernesto C., Thomas R.G., Klauber M.R., Schafer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., Schneider L.S., Thal L.J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease The Alzheimer's disease cooperative study. *The New England Journal of medicine*, 336: 1216-1222
- [17] Yamauchi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T., Yasuhara H. (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke*, 29: 12-17
- [18] Gindberg M.D. (1997) The new language of cerebral ischemia. *American journal of neuroradiology*, 18: 1435-1445
- [19] Burcher S.P., Henshall D.C., Teramura Y., Iwasaki K., Sharkey J. (1997) Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: In vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 17: 6939-6946
- [20] Lyden P., Wahlgren N.G. (2000) Mechanism of action of neuroprotectants in stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 9: 9-14
- [21] Pitsikas N., Brambilla A., Besozzi C., Bonali P., Fodritto F., Grippa N., Scandroglio A., Borsini F. (2001) Effects of cerestat and NBQX on functional and morphological outcomes in rat focal ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 68: 443-447
- [22] Takahashi M., Kohara A., Shishikura J., Kawasaki-Yatsugi S., Ni J.W., Yatsugi S., Sakamoto S., Okada M., Shimizu-Sasamata M., Yamaguchi T. (2002) YM872: a selective, potent and highly water-soluble alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor antagonist. *CNS drug reviews*, 8: 337-352

- [23] Fogelholm R., Erilä T., Palomäki H., Murros K., Kaste M. (2000) Effect of nimodipine on final infarct volume after acute ischemic stroke. *Cerebrovascular diseases*, 10: 189-193
- [24] Asakura K., Matsuo Y., Oshima T., Kihara T., Minagawa K., Araki Y., Kagawa K., Kanemasa K., Ninomiya M. (2000) Omega-agatoxin IVA-sensitive  $Ca^{2+}$  channel blocker, alpha-eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 394: 57-65
- [25] Muir K.W., Holzapfel L., Lees K.R. (2000) Phase II clinical trial of sipatrigine (619C89) by continuous infusion in acute stroke. *Cerebrovascular diseases*, 10: 431-436
- [26] Nelson R.M., Green A.R., Lambert G.D., Hainsworth A.H. (2000) On the regulation of ischemia induced glutamate efflux for rat cortex by GABA; in vitro studies with GABA, clomethiazole and pentobarbitone. *British Journal of Pharmacology*, 130: 1124-1130
- [27] Lyden P., Shuaib A., Ng K., Levin K., Atkinson R.P., Rajput A., Wechsler L., Ashwood T., Claesson L., Odergren T., Salazar-Grueso E. (2002) Clomethiazole acute stroke study in ischemic stroke (CLASS-I): Final results. *Stroke*, 33: 122-129
- [28] Lynch M.A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* 84: 87-136
- [29] Arundine M., Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. 34: 325-337
- [30] Chen H.S., Lipton S.A. (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 97: 1611-1626
- [31] Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 51: 7-61
- [32] Paoletti P., Neyton J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7: 39-47
- [33] Kew J.N., Kemp J.A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179: 4-29
- [34] Lipton S.A., Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nature reviews. Neuroscience*, 8: 803-808
- [35] Davis S.M., Lees K.R., Albers G.W., Diener H.C., Markabi S., Karlsson G., Norris J. (2000) Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke*, 31: 347-354

- [36] Jansen M., Dannhardt G. (2003) Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDA receptor for therapeutic interventions. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 661-670
- [37] Sacco R.L., DeRosa J.T., Haley E.C. Jr., Levin B., Ordronneau P., Phillips S.J., Rundek T., Snipes R.G., Thompson J.L. (2001) Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 285: 1719-1728
- [38] Muir K.W., Lees K.R. (1995) Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke*, 26: 503-513
- [39] Javitt D.C., Zukin S.R. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American journal of Psychiatry*, 148: 1301-1308
- [40] Sams-Dodd F. (1997) Effect of novel antipsychotic drugs on phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. *Behavioural pharmacology*, 8: 196-215
- [41] Adams B., Moghaddam B. (1998) Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *The Journal of Neuroscience*, 18: 5545-5554
- [42] Ellison G. (1994) The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical model of the dementias. *Brain Research Reviews*, 20: 250-267
- [43] Price R.B., Nock M.K., Charney D.S., Mathew S.J. (2009) Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*, 66: 522-526
- [44] Kemp J.A., McKernan R.M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience*, 5: 1039-1042
- [45] Lin B., Dietrich W.D., Ginsberg M.D., Globus M.Y., Busto R. (1993) MK-801 (dizocilpine) protects the brain from repeated normothermic global ischemic insults in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13: 925-932
- [46] Vales K., Rambousek L., Stuchlik A., Chodounska H., Vyklicky L. (2010). Srovnání vlivu systémové aplikace non-kompetitivních a use-dependentních NMDA antagonistů na lokomoční aktivitu a kognitivní funkce u laboratorního potkana. *Psychiatrie*, 2:26-30.
- [47] Morris B.J., Cochran S.M., Pratt J.A. (2005) PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Current Opinion in Pharmacology*, 5: 101-106

- [48] Kovacic P., Somanathan R. (2010) Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3: 13-22
- [49] Chen H.S., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K., Lei S.Z., Warach S., Jensen F.E., Lipton S.A. (1992) Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 12: 4427-4436
- [50] Chen H.S., Lipton S.A. (2005) Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 314: 961-971
- [51] Levi M.S., Brimble M.A. (2004) A review of neuroprotective agents. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 2383-2397
- [52] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol> 20. 8. 2012
- [53] Mellon S.H., Vaudry H. (2001) Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *International review of neurobiology*, 46: 33-78
- [54] Mellon S.H., Deschepper C.F. (1993) Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain research*, 629: 283-292
- [55] Compagnone N.A., Mellon S.H. (2000) Neurosteroids: Biosynthesis and fiction of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21: 1-56
- [56] Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L., Mellon S.H. (1995) Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136: 5212-5223
- [57] Mellon S.H. (1994) Neurosteroids: Biochemistry, models of action, and clinical relevance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78: 1003-1008
- [58] Dubrovsky B.O., (2005) Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 29: 162-192

- [59] Korinek M., Kapras V., Vyklicky V., Adamusova E., Borovska J., Vales K., Stuchlik A., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L. Jr. (2011) Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*, 76: 1409-1418
- [60] Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., Vyklický L Jr. (2005) 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of neuroscience*, 25: 8439-8450
- [61] Borovska J., Vyklicky V., Stastna E., Kapras V., Slavikova B., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L. Jr. (2011) Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British journal of pharmacology*, 166: 1069-1083
- [62] Weill-Engerer S., David J.P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E.E., Akwa Y. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87: 5138-5143
- [63] Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular pharmacology*, 40: 333-336
- [64] Horak M., Vlcek K., Petrovic M., Chodounska H., Vyklicky L. Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of neuroscience*, 24: 10318-10325
- [65] Simon J., Wakimoto H., Fujita N., Lalande M., Barnard E.A. (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of biological chemistry*, 279: 41422-41435
- [66] Möhler H., Fritschy J.M., Crestani F., Hensch T., Rudolph U. (2004) Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochemical pharmacology*, 68: 1685-1690
- [67] Möhler H., Crestani F., Rudolph U. (2001) GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 1: 22-25
- [68] Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. (1990) Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Molecular pharmacology*, 37: 597-602



- [69] Callachan H., Cottrell G.A., Hather N.Y., Lambert J.J., Nooney J.M., Peters J.A. (1987) Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proceedings of the Royal Society of London*, 231: 359-369
- [70] Park-Chung M., Malayev A., Purdy R.H., Gibbs T.T., Farb D.H. (1999) Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain research*, 830: 72-87
- [71] Mienville J.M., Vicini S. (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain research*, 489: 190-194
- [72] Mysliveček J. a kol. (2009) *Základy neurovědy*. Triton, ISBN 978-80-7387-088-1
- [73] Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y. (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease. *Circulation Journal*, 73(3), 411-418
- [74] Casals J.B., Pieri N.C., Feitosa M.L., Ercolin A.C., Roballo K.C., Barreto R.S., Bressan F.F., Martins D.S., Miglino M.A., Ambrósio C.E. (2011) The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative medicine*, 61: 305-313
- [75] Bacigaluppi M., Comi G., Hermann D.M. (2010) Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The open neurology journal*, 4: 34-38
- [76] Hermann D.M., Kilic E., Hata R., Hossmann K.A., Mies G. (2001) Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 104: 947-955
- [77] Brint S., Jacewicz M., Kiessling M., Tanabe J., Pulsinelli W. (1988) Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 8: 474-485
- [78] Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L., Maricq H., Balentine J.D. (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*, 17: 738-743
- [79] Takeo S., Miyake K., Tanonaka K., Tanonaka R., Taguchi T., Okano K., Inoue K., Ohga Y., Kishimoto Y. (1991) Time course of changes in brain energy

metabolism of the rat after microsphere-induced cerebral embolism. Japanese journal of pharmacology, 55: 197-209

[80] Horie N., Maag A.L., Hamilton S.A., Shichinohe H., Bliss T.M., Steinberg G.K. (2008) Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. Journal of neuroscience methods, 173: 286-290

[81] Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Annals of neurology, 17: 497-504

[82] Smith M.L., Bendek G., Dahlgren N., Rosén I., Wieloch T., Siesjö B.K. (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. Acta neurologica Scandinavica, 69: 385-401

[83] Coyle P. (1976) Vascular patterns of the rat hippocampal formation. Experimental neurology, 52: 447-458

[84] Chi O.Z., Wei H.M., Klein S.L., Weiss H.R. (1994) Effect of ketamine on heterogeneity of cerebral microregional venous O<sub>2</sub> saturation in the rat. Anesthesia and analgesia, 79: 860-866

[85] Proescholdt M., Heimann A., Kempinski O. (2001) Neuroprotection of S(+) ketamine isomer in global forebrain ischemia. Brain research, 904: 245-251

[86] Chi O.Z., Anwar M., Sinha A.K., Weiss H.R. (1991) Effects of MK-801 on cerebral regional oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats. Circulation research, 69: 414-420

[87] Fidalgo A.R., Cibelli M., White J.P.M., Nagy I., Wan Y. (2012) Isoflurane causes neocortical but not hippocampal-dependent memory impairment in mice. Acta anesthesiologica Scandinavica, 56: 1052-1057

[88] Homola A., Zoremba N., Slais K., Kuhlen R., Syková E. (2006) Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. Neuroscience letters, 404: 137-142

[89] Anderova M., Vorisek I., Pivonkova H., Benesova J., Vargova L., Cicanic M., Chvatal A., Sykova E. (2011) Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 31: 894-907

- [90] Zoremba N., Homola A., Slais K., Vorísek I., Rossaint R., Lehmenkühler A., Syková E. (2008) Extracellular diffusion parameters in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28: 1665-1673
- [91] Li Z., Cui S., Zhang Z., Zhou R., Ge Y., Sokabe M., Chen L. (2009) DHEA-neuroprotection and -neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29: 287-296
- [92] Li Z., Zhou R., Cui S., Xie G., Cai W., Sokabe M., Chen L. (2006) Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor. *Neuropharmacology*, 51: 958-966
- [93] Weaver C.E. Jr., Marek P., Park-Chung M., Tam S.W., Farb D.H. (1997) Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94: 10450-10454
- [94] Lapchak P.A. (2004) The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain research*, 997: 152-158
- [95] Lapchak P.A. (2006) 3alpha-OL-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a steroidal low-affinity NMDA receptor antagonist improves clinical rating scores in a rabbit multiple infarct ischemia model: synergism with tissue plasminogen activator. *Experimental Neurology*, 197: 531-537